

Enzyme aus Organismen der Gattung *Pleurotus* für technische Anwendungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Robin-Hagen Leonhardt

geboren am 08.08.1985 in Rathenow

Hannover, 2016

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger
Korreferent: Prof. Dr. D. Hoffmeister
Tag der Promotion: 01.06.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, der mir die Möglichkeit gab, ein spannendes und forderndes Thema unter großartigen Bedingungen zu bearbeiten und dabei stets durch entgegengebrachtes Vertrauen und aufschlussreiche Diskussionen behilflich war.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlichst bei Frau Dr. Katerina Zelena, die mir besonders während meiner Anfangszeit am Institut hilfreich zu Seite stand.

Frau Dr. Diana Linke danke ich für die Betreuung bei allen kleinen und auch größeren Schwierigkeiten im Labor sowie die großartige Unterstützung (und Vorarbeit) während des zweiten Teilprojektes meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Unterstützung hinsichtlich der analytischen Methoden während meiner Promotionszeit, sowie die unterhaltsamen Diskussionen über die vergangenen Bundesliga-Spieltage.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Hoffmeister (Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) für die Übernahme des Korreferats, sowie die positive Beeinflussung meiner wissenschaftlichen Laufbahn schon während meiner Studienzeit.

Herrn Prof. Dr. Claus-Peter Witte (Institut für Pflanzenernährung, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes meiner Disputation.

Dank gilt ebenfalls dem BMBF Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) sowie der Henkel AG (Düsseldorf) für die Unterstützung der bearbeiteten Projekte.

Ich danke allen Kollegen des Instituts für Lebensmittelchemie für die wunderbare Arbeitsatmosphäre sowie die konstruktive Zusammenarbeit. Besonders möchte ich Marlene Florian, Paul, Sebastian und Luci danken, die immer für einen Spaß zu haben und oft auch mit hilfreichen oder aufmunternden Worten zur Stelle waren.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern Kerstin und Thorsten sowie meine Schwester Nadine für die Unterstützung, Motivation und Aufmunterung während der letzten Jahre danken.

Abschließend gilt größter Dank meiner Frau Mareen, ohne deren Antrieb, Enthusiasmus, Verständnis und Unterstützung ich diese Promotion wohl weder begonnen noch abgeschlossen hätte.

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 2011 und Dezember 2015 am Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger erarbeitet.

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

Leonhardt, R.; Plagemann, I.; Linke, D.; Zelena, K.; Berger, R. G.: Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. - A comparison of substrate specificity and sequence homology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. 97, 189-195, DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.08.014

Leonhardt, R.; Krings, U.; Berger, R. G.; Linke, D.: Heterologous production of the stain solvolytic peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, online, DOI: 10.1007/s00449-016-1564-2

Unterstützt wurde die Forschung durch das BMBF Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) sowie die Henkel AG (Düsseldorf).

Nachfolgend gelistete Veröffentlichungen und Poster wurden im Rahmen dieser Dissertationsschrift erarbeitet, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

Leonhardt, R.; Berger, R.G.: Nootkatone, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 2014, Ed. J. Schrader, DOI 10.1007/10_2014_279

Berger, R.G.; **Leonhardt, R.;** Zelena, K.; Krings, U.; Hartwig, S.; Beutel, S.; Scheper, T.: Terpene hydroperoxides – Neglected precursors of flavours, Proc., 10th Wartburg Flavour Symposium 2013, DFA 2014, 146-151

Linke, D.; **Leonhardt, R.**; Eisele, N.; Petersen, L. M.; Riemer, S.; Nimtz, M.; Berger, R. G.: Carotene-degrading activities from *Bjerkandera adusta* possess an application in detergent industries, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38, 1191-1199, DOI: 10.1007/s00449-015-1361-3

Hellmuth, H.; Weber, T.; O'Connell, T.; Tondera, S.; Linke, D.; Berger, R. G.; **Leonhardt, R.**: A proteinase of *Pleurotus pulmonarius* for use in washing and cleaning agents. (2015), Patentnummer DE102013226729A1

Vortrag

Leonhardt, R.; Seibel, T.; Kolwek, J.; Krings, U.; Berger, R. G.: Oxyfunctionalization of terpene substrates using fungal enzymes. Scale-up and scale-down of bioprocesses. DECHEMA Tagung Hamburg-Bergedorf. 11.-13. Mai 2015

Posterpräsentation

Kelle, S.*; **Leonhardt, R.***; Berger, R. G.: Recombinant expression of lipoxygenases from different *Pleurotus* spp.; Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, Regionalverband Nord, Arbeitstagung 2014, Food Science Meets Industry, 24.-25. März 2014, *gleichwertige Beteiligung

Zusammenfassung

Die Anwendung von Biokatalysatoren ist ein stetig wachsender Bereich in industriellen Prozessen, ob Lebensmittelherstellung oder Synthese von Feinchemikalien. Die dabei angewandten Prozesse sind oft einzigartig und verlangen nach hochspezialisierten Enzymen, um optimal unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen arbeiten zu können. Die Suche nach neuen, möglicherweise besser geeigneten Enzymen ist deshalb ein großer Forschungsbereich. Dabei können neue Biokatalysatoren durch gezielte Veränderungen an bereits bekannten Enzymen generiert werden. Einen vielversprechenden Ansatz stellt, wie auch in der vorliegenden Arbeit thematisiert, die Suche nach Homologen eines bereits bekannten Gens dar, da bereits kleine Unterschiede in der Aminosäureabfolge eines Enzyms große Auswirkungen haben können.

Beiden Publikationen liegen Vorarbeiten zu Grunde, in welchen ein Gen aus einem Organismus der Gattung *Pleurotus* exprimiert und das korrespondierende Enzym charakterisiert werden konnte. Basierend auf dem vorhandenen Wissen, sollten homologe Gene amplifiziert und anschließend aktive Enzyme produziert werden.

1. Im Fall der Lipoxygenase 1 (LOX1) wurden Sequenzen der codierenden Gene aus mehreren *Pleurotus* spec. amplifiziert und mit Hilfe des etablierten Expressionssystems *E. coli* und pCOLD DNA I die Enzyme aktiv produziert. Insgesamt wurden fünf Lipoxygenase-Gene und die korrespondierenden Enzyme miteinander verglichen. Zusätzlich wurde eine Deletionsmutante kloniert, welche Aufschluss über den Effekt der N-Terminalen β -barrel Struktur geben sollte. Während die Aktivitäten mit dem Standardsubstrat Linolsäure identisch waren, zeigte sich in Biotransformationen mit Valencen und Pilzlyophilisat, dass sich Enzyme, welche auf Aminosäureebene in zwei Cluster einzuordnen waren, auch in ihren Nootkaton-Ausbeuten unterschieden. Die verkürzte LOX1-Variante wurde zwar löslich produziert, zeigte jedoch keine Aktivität im Linolsäure-Assay oder während der Valencen-Biotransformation.
2. Eine Subtilisin-ähnliche Peptidase aus *Pleurotus pulmonarius* wurde auf Grund ihrer potenziellen Eignung für den Einsatz in Detergenzien zur Homogenität gereinigt und anschließend per Proteinsequenzierung identifiziert. Das Gen, homolog zum bereits bekannten Peptidase-Gen *popI*, wurde amplifiziert und als sequenzoptimierte Variante in *Pichia pastoris* heterolog exprimiert. Mit Hilfe einer zusätzlichen Kozak-Sequenz gelang es, das Enzym intrazellulär aktiv zu produzieren. Sowohl die Reaktionsoptima (pH > 8,5; 40 °C), als auch die Fähigkeit, standardisiert verschmutzte Lämpchen (Blut, Tusche, Milch) zu bleichen, unterstrichen die angestrebte Anwendung in kommerziellen Waschmitteln.

Schlagwörter: Basidiomycota; *Pleurotus*; Enzym; Lipoxygenase; Peptidase; Waschmittel

Abstract

The application of biocatalysts is of growing interest in industrial applications such as food processing or the synthesis of fine chemicals. The utilized processes often feature unique reaction conditions and require highly specialized enzymes, which are functional in the given environment. The search for new, possibly more suitable enzymes is an important field in current biochemical research. New biocatalysts may be obtained from previously known precursors by slight adaptations of the amino acids sequences of the proteins. A very promising approach, as addressed in the present work, is a screening for homologous genes in closely related species, as even small alterations in the amino acid sequence of the resulting protein may have a large influence on the characteristics of an enzyme.

Both publications in this work are based on previous projects, in which genes from organisms of the genus *Pleurotus* were successfully expressed. The corresponding enzymes were produced in their active form and characterized biochemically.

1. Based on the known sequence of the Lipxygenase 1 gene (*lox1*) from *Pleurotus sapidus*, orthologous sequences from several *Pleurotus* spec. were amplified. Using the adapted expression system of *E. coli* and pCOLD DNA I, the respective enzymes were produced. Five genes and the corresponding proteins were compared. Additionally, a deletion mutant of *lox1* was cloned, which eliminated the *N*-terminal β -barrel structure. While the activities of the enzymes toward their standard substrate linoleic acid were identical, it was shown that the lipxygenases differed in the biotransformation assay with valencene and lyophilized mycelium. Two clusters appearing when comparing the amino acid sequences were also present for the nootkatone yields in the biotransformation. The truncated LOX1 was obtained in a soluble form but did not show any activity in the linoleic acid assay of the biotransformation.
2. A subtilisin-like peptidase from *Pleurotus pulmonarius* was purified to homogeneity and identified by protein sequencing, due to its apparent suitability for detergent applications. The gene, homologous to the known *pop1* from *Pleurotus ostreatus*, was amplified, subjected to sequence optimization and heterologously expressed in *Pichia pastoris*. Incorporating an additional Kozak sequence, it was possible to produce the enzyme (PPP1) intracellularly and in its active form. Its reaction optima (pH > 8.5; 40 °C) as well as its ability to bleach pre-stained fabrics (blood, India ink, milk) underlined the potential of the enzyme for industrial detergent applications.

key words: Basidiomycota; *Pleurotus*; enzyme; lipxygenase; peptidase; detergent

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Evolution von Biokatalysatoren	1
1.1.1 Analogie	2
1.1.2 Homologie.....	3
1.1.2.1 Orthologie	3
1.1.2.2 Paralogie.....	4
1.1.3 Xenologie	5
1.2 DNA-Mutationen.....	6
1.2.1 <i>Frame-shift</i> , Insertion, Deletion	8
1.2.2 <i>Replication slippage</i>	8
1.2.3 Verdopplung.....	8
1.2.4 Transposons	10
1.2.5 Viraler Gentransfer.....	10
1.3 Optimierung von Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen.....	11
1.3.1 Ziele und Wege der Sequenzoptimierung	11
1.3.2 Sequenzbasierter Ansatz – Suche nach natürlich vorkommenden Vorlagen	12
1.3.3 <i>Random Mutagenesis/Directed Evolution</i>	14
1.3.4 <i>Rational Protein Design</i>	14
1.3.4.1 Thermostabilität/-aktivität	15
1.3.4.2 pH-Stabilität	17
1.3.4.3 Enantioselektivität/Substratspezifität	19
1.3.4.4 Weitere Optimierungsansätze.....	20
1.4 Basidiomycota als Enzymquelle.....	21
1.4.1 Genetische Vielfalt.....	21
1.4.2 Untersuchte Enzymklassen	22
1.4.2.1 Lipxygenasen	22
1.4.2.2 Peptidasen	24
2. Zielsetzung.....	27
3. Vorwort: “Orthologous Lipxygenases of <i>Pleurotus spp.</i> - A Comparison of Substrate Specificity and Sequence Homology”	28

4. “Orthologous Lipoxygenases of <i>Pleurotus spp.</i> - A Comparison of Substrate Specificity and Sequence Homology”	30
4.1 Abstract	30
4.2 Keywords	30
4.3 Highlights	30
4.4 Introduction	31
4.5 Materials and Methods	32
4.5.1 Chemicals	32
4.5.2 Strains, culturing conditions and activity screening	32
4.5.3 Linoleic acid assay	33
4.5.4 (+)-valencene biotransformation	33
4.5.5 Nucleic acid extraction	34
4.5.6 cDNA synthesis	34
4.5.7 Primer design, PCR and cloning	34
4.5.8 Sequence analysis	35
4.5.9 Gene expression and protein purification	35
4.5.10 Gas chromatography/flame ionisation detection (GC/FID)	36
4.6 Results/Discussion	36
4.6.1 Screening	36
4.6.2 Analysis of nucleotide and derived amino acid sequence of the lipoxygenase genes	38
4.6.3 Cloning of a truncated lipoxygenase gene	40
4.6.4 Recombinant protein production and purification	41
4.6.5 Biochemical characterization of lipoxygenase properties	42
4.6.6 (+)-valencene biotransformation	43
4.7 Conclusion	44
4.8 Acknowledgement	44
5. Vorwort: “Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from <i>Pleurotus pulmonarius</i>”	45
6. “Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from <i>Pleurotus pulmonarius</i>”	46
6.1 Abstract	46
6.2 Keywords	46
6.3 Introduction	46
6.4 Materials and Methods	47
6.4.1 Materials	47
6.4.2 Strains, culture media and culturing conditions	48
6.4.3 Purification and identification of PPP1	48
6.4.4 Gene identification and amplification	49

6.4.5	Construction of the peptidase expression vector	49
6.4.6	Culture conditions for gene expression	50
6.4.7	Bioreactor cultivation.....	51
6.4.8	Purification of heterologous protein PPP1	51
6.4.9	Peptidase activity assays	51
6.4.10	Gel electrophoresis and protein identification.....	52
6.5	Results/Discussion.....	53
6.5.1	Purification and identification of the native peptidase PPP1 from the culture supernatant	53
6.5.2	Sequence analysis and cloning of expression constructs.....	54
6.5.3	Gene expression and protein purification.....	55
6.5.4	Biochemical characterization	57
6.5.5	Application assay	59
6.6	Conclusion	60
6.7	Acknowledgement	60
7.	Ausblick.....	61
7.1	Lipoxygenasen.....	61
7.2	Peptidasen.....	61
Literaturverzeichnis.....		64
Lebenslauf		80

Abkürzungsverzeichnis

AAPF	Z-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -Nitroanilid
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)Benzenesulfonylfluorid
AS	Aminosäuren
BER	base excision repair
BMMY	<i>buffered methanol medium + yeast extract</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CNV	<i>copy number variants</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
GC	Gaschromatographie
IEF	<i>isoelectric focussing</i>
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
K_m	Michaeliskonstante
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>
<i>lox1</i> /LOX1	Lipoxygenase 1-codierendes Gen/Lipoxygenase 1
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molar
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NGT	N-Glykosyltransferase

nLC-ESI-QTOF-MS/MS	<i>liquid chromatography - electron spray ionization - quadrupole time of flight - mass spectrometry</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pCOLD DNA I	Kälteschock-Expressionsvektor für <i>Escherichia coli</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>pop1</i> /POP1	<i>Pleurotus ostreatus</i> Peptidase-codierendes Gen/Peptidase
pPIC9K	Expressionsvektor für <i>Pichia pastoris</i>
<i>ppp1</i> /PPP1	<i>Pleurotus pulmonarius</i> Peptidase-codierendes Gen/Peptidase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SNL	Standardnährlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (μmol/s)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
YPD/YEPD	<i>yeast (extract) peptone dextrose</i>

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

1. Einleitung

1.1 Die Evolution von Biokatalysatoren

Das gesamte Leben auf der Erde beruht auf dem stetigen Prinzip der Veränderung, Selektion und folglich der Weiterentwicklung und Verbesserung relevanter Komponenten in einem Organismus, der Evolutionstheorie von Charles Darwin folgend [1, 2]. Die Veränderung von Organismen und deren biochemischer Ausstattung ist dabei ständigen Mutationen ihrer genetischen Informationen zuzuschreiben. Diese konsequente Entwicklung gewährleistet die Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen und Lebensräume sowie die Spezialisierung und schließlich die Besetzung verschiedener Nischen. Besonders Biokatalysatoren haben im Laufe der Jahrtausende große Veränderungen durchlaufen, wodurch eine Vielfalt an Lebewesen und bioaktiven Molekülen entstand, die, seit der Entdeckung der Biokatalysatoren im Jahr 1833 [3], bis heute erst in ihren Ansätzen erforscht ist.

Die Entwicklung begann, der RNA-Welt-Hypothese zufolge, mit einer relativ einfachen Welt der Biomoleküle, in der die Ribonukleinsäuren (RNA) sowohl Informationsträger als auch katalytisch aktive Moleküle darstellten [4]. So genannte Ribozyme sind auch heute noch elementare Biokatalysatoren, die an wichtigen Prozessen im Organismus teilhaben. Besonders hervorzuheben sind dabei die Ribosomen. Diese großen Komplexe setzen sich nicht nur aus einer Vielzahl von Proteinen, sondern auch aus den drei großen RNA-Bausteinen zusammen, wobei in Eukaryoten die 28S-RNA und in Prokaryoten die 23S-RNA eine essentielle katalytische Aktivität bei der Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren besitzen [4].

Die Zusammensetzung biokatalytisch aktiver Moleküle, bestehend aus eben diesem Aminosäuregrundgerüst, stellte einen großen Schritt in der Entwicklung von Biokatalysatoren dar und ermöglichte, auch auf Grund der größeren Anzahl der Grundbausteine und der Modularität, eine höhere Vielseitigkeit sowie Evolvierbarkeit der Biokatalysatoren [1]. Dabei waren Proteine nicht von Beginn an aus den heute bekannten 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut, sondern aus einem reduzierten Satz, wodurch die ersten Proteine von einfacherer Bauart geprägt waren [1].

Vor allem die degenerierte Kodierung der Erbinformationen in Form von DNA und RNA ermöglichte die heute vorliegende Vielfältigkeit der Enzyme. Durch fortwährende Mutationen der Erbinformation und den daraus resultierenden Änderungen der Aminosäureabfolge wurden in einem kontinuierlichen Wechsel aus Versuch und Irrtum die Biokatalysatoren dem Bedarf des jeweiligen Organismus, dem Prinzip *survival of the fittest*

folgend, angepasst und optimiert. Dabei stehen Aminosäureänderungen, die zu einem Funktionsgewinn (*gain of function*) führen, denen gegenüber, welche die Aktivität des Proteins negativ beeinflussen [5]. Die Entwicklung geeigneter Biokatalysatoren muss dabei keineswegs ein langfristiges Unterfangen sein, wie man anhand der schnellen Adaption verschiedener Mikroorganismen an immer neue Antibiotika erkennen kann [5].

Auf Proteinebene vollzog sich eine stetige Spezialisierung der Biokatalysatoren, weg von anfänglich breiter Substratspezifität, hin zu immer spezifischeren Reaktionen [3]. Bereits bestehende Aktivitäten wurden dabei graduell verändert und ohne negative Beeinflussung der Fitness (Überlebenschance) des Organismus entwickelt. Bevorteilt waren dabei die Enzyme, die mit geringstmöglichem Aufwand angepasst werden konnten [6]. Besonders die Promiskuität, d. h. die Eigenschaft mancher Enzyme, Nebenreaktionen katalysieren zu können, ist in der natürlichen Selektion bzw. Entwicklung von Enzymen, genau wie in Ansätzen der *Directed Evolution*, von großer Bedeutung.

In der Folge soll das Augenmerk auf die Grundlagen der Verwandtschaft und die Mechanismen, die diese Verwandtschaft bedingen, gerichtet werden, welche im Laufe der natürlichen Evolution zur Vielfaltigkeit der heute bekannten Proteine und Enzyme führten.

1.1.1 Analogie

Ähnlich der degenerierten DNA-Kodierung sind auch spezifische Reaktionen nicht zwangsläufig auf Enzyme zurückzuführen, die einander ähneln müssen. Im Laufe der Evolution entstanden und entwickelten sich Enzyme, die sowohl von der Sequenz als auch der resultierenden 3D-Struktur her unterschiedlich sind, dennoch aber eine identische Reaktion katalysieren können [7]. Dabei spricht man von analogen Enzymen. Ein besonders anschauliches Beispiel für die Entstehung eines Analogons findet sich dabei in der Tierwelt. Vergleicht man Gliedmaßen von Vögeln und Fledermäusen, wird offensichtlich, dass der Zweck (die Reaktion) dem Flug dient, der Aufbau (die Struktur/Sequenz) allerdings nicht miteinander verwandt sind [8]. Das heißt, dass diese beiden Strategien, den Flug zu entwickeln, nebeneinander entstanden und demnach analog zueinander sind.

Auf die Enzymebene bezogen bedeutet das vor allem, dass die unterschiedliche Faltung und das Fehlen von bestimmten, sonst konservierten Motiven ein Indikator für das Vorliegen eines analogen Enzyms sind [7]. Besonders im Vergleich zwischen verschiedenen Abstammungslinien finden sich solche von der Reaktion gleichen, aber mechanistisch verschiedenen Biokatalysen.

Galten analoge Enzyme noch vor einigen Jahren als eher selten, so zeigte sich auf Grund des zunehmenden Umfangs von Sequenzbibliotheken, dass Analogien mittlerweile häufiger beobachtet werden können [9]. Dabei ist auffällig, dass analoge Enzyme in allen relevanten Stoffwechselwegen auftreten können und dabei oft neben Enzymen vorliegen, welche (domänenübergreifend) hochkonserviert sind [7].

Ein ansprechendes Beispiel findet sich im Mechanismus für die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen in Bakterien. Sowohl die *N*-Glykosyltransferase (NGT) als auch die Oligosaccharyltransferase katalysieren eine ähnliche Reaktion und erkennen dieselbe Glykosylierungsstelle N-X-S/T. Die Enzyme besitzen allerdings keine Sequenzähnlichkeit zueinander und haben sich demzufolge unabhängig voneinander entwickelt [10].

1.1.2 Homologie

Im Gegensatz zur Analogie zweier Enzyme handelt es sich im Fall von Homologie um ähnliche Enzyme, die per Definition einen gemeinsamen Vorfahren haben, das heißt, sich von einem gemeinsamen Vorläufer aus weiterentwickelt haben. Dabei unterscheidet man zwischen horizontalem und vertikalem Gentransfer und der daraus resultierenden Entwicklung des betreffenden Gens und folglich des Enzyms. Orthologie und Paralogie, wie in der Folge erläutert, sind dabei Begriffe, die der Vereinfachung und Beschreibung der komplexen Verwandtschaftsverhältnisse dienen [11]. Dabei können Sequenzunterschiede als ein vereinfachtes Maß der Evolution verwendet werden, basierend auf Mutationen, die sich seit der Artbildung akkumuliert haben [11, 12].

Die Einteilung der folgenden Verwandtschaftsverhältnisse ist nicht immer trivial und eindeutig, weshalb dieses System nur eine vereinfachte Darstellung erlaubt.

1.1.2.1 Orthologie

Orthologe Gene und daraus resultierende Proteine entstehen per Definition aus einer Speziation (Artneubildung), indem das gesamte Genom weitergegeben wird und später, in Folge weiterer Zellteilungen, Mutationen in den Genen aufzeigt (Abbildung 1-1). Orthologie ist besonders in der Bioinformatik von großer Bedeutung, da orthologe Proteine zur Erforschung des Einflusses bereits kleinster Sequenzänderungen dienen können. Die bioinformatische Erforschung orthologer Gene dient zur Einteilung von Proteinfamilien und Funktionsvorhersagen in sequenzierten Genomen [13, 14].

Orthologe Proteine sind homolog, weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und katalysieren oft die gleiche Reaktion im Organismus [7, 15-17]. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Sequenzähnlichkeit, da die Funktion des Enzyms nicht zwangsweise konserviert sein muss [11].

Neben seltenen funktionellen Unterschieden von Enzymen können auch Abweichungen in der Domänenarchitektur orthologer Proteine vorliegen, was in eukaryotischen Zellen beobachtet werden konnte.

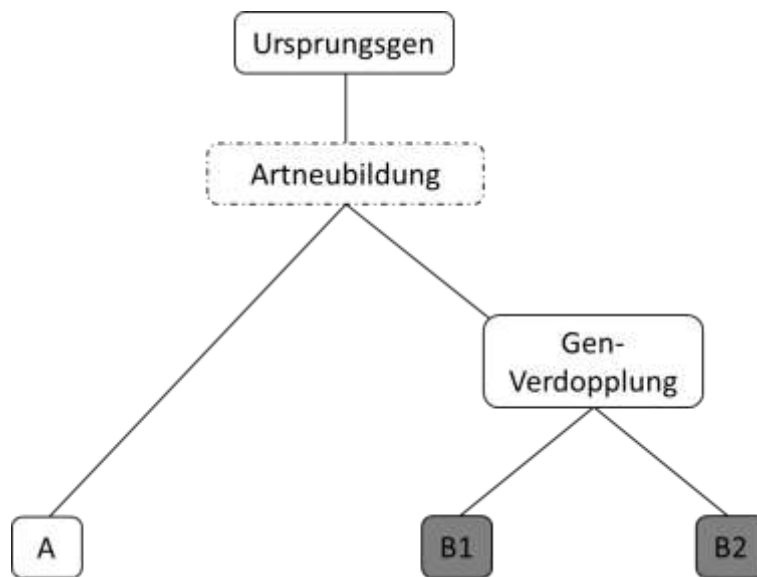


Abbildung 1-1

Schematische Darstellung der Entstehung orthologer bzw. paraloger Gene. Gen A und Gen B entstehen aus Artneubildung, während B1 und B2 aus einer Genduplikation hervorgehen. Gen A ist ortholog zu B1 und B2. B1 und B2 sind Paraloge.

1.1.2.2 Paralogie

Der Entstehung paraloger Gene im Organismus geht immer die Duplikation eines Gens im Genom voraus (Abbildung 1-1) [15, 16, 18]. Paraloge Gene sind per Definition verschiedener zueinander als orthologe [17]. Allerdings muss bei dieser verallgemeinernden Aussage beachtet werden, dass auch der Zeitpunkt der Gendopplung einen Einfluss hat. So können sich junge und alte Paraloge voneinander unterscheiden, da sich über die Zeit wieder Mutationen in der Sequenz akkumulieren [16]. Zusätzlich kann man die Verwandtschaft von Paralogen durch Eingrenzung des Zeitpunkts der Genduplikation näher definieren, wobei „*outparalogs*“ durch Gendopplung vor und „*inparalogs*“ nach Artbildung entstehen [15].

Die Verdopplung eines Gens führt zur Redundanz des kodierten Proteins [16]. Das hat zur Folge, dass das neu entstandene Gen einem veränderten und wahrscheinlich geringeren Selektionsdruck im Organismus unterliegt (Abbildung 1-2) [15, 19]. Zusätzlich kann auch das Expressionslevel des Paralog gegenüber dem ursprünglichen Gen verändert sein [16, 20]. Diese Faktoren beeinflussen die Entwicklung eines Paralog, welches sich nach der Dopplung deutlich schneller weiterentwickeln kann [19, 21]. So können paraloge Enzyme schlussendlich trotz hoher Sequenzähnlichkeit unterschiedliche Reaktionen katalysieren, welche aber meist mechanistisch ähnlich zum Ursprungsenzym sind [15].

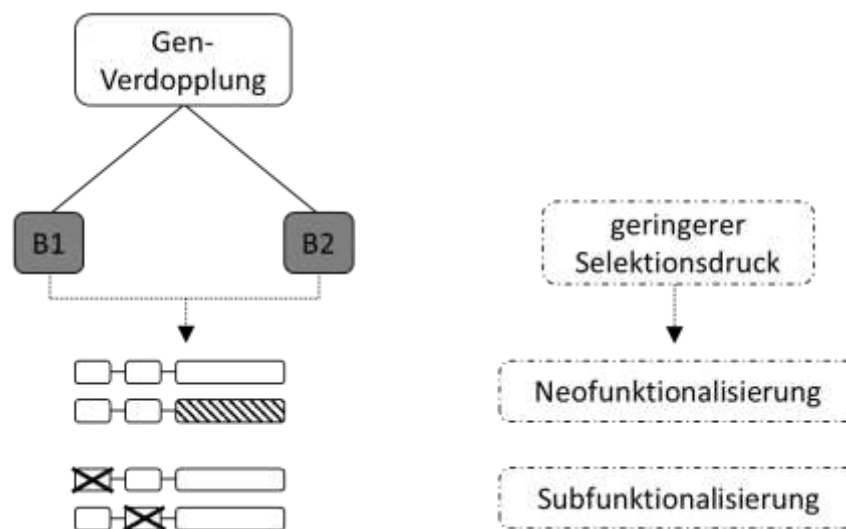


Abbildung 1-2

Das Schema stellt die potenziellen Veränderungen nach Entstehung zweier orthologer Gene dar. Es besteht die Möglichkeit, dass es durch den verringerten Selektionsdruck auf eines der beiden Gene zu Sequenzveränderungen kommen kann. B1 und B2 sind Paraloge. Nach Presgraves [21].

1.1.3 Xenologie

Die Beziehung von Genen und Proteinen beschränkt sich nicht ausschließlich auf die Vererbung bzw. die Duplikation im Genom, sondern kann auch horizontalen (lateralen) Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies beinhalten. Die Weitergabe von genetischen Informationen zwischen zwei Spezies findet sich besonders häufig in Prokaryoten, z. B. mittels Konjugation und folgender Weitergabe gesamter Plasmide bei gramnegativen Bakterien. Diese ist von großer Bedeutung für die genetische Vielfalt und die schnelle Anpassungsfähigkeit dieser Organismen [22]. Etwa 15 % aller Gene in *Escherichia coli* weichen in der *codon usage* stark von den *E. coli*-eigenen Genen ab [23]. Diese Diskrepanz ist ein klarer Indikator für eine xenologe Herkunft des jeweiligen untersuchten Gens. Der Einfluss des horizontalen Transfers zwischen Bakterien kann verdeutlicht werden, indem

gesamte Genome verwandter Spezies verglichen werden. Dort zeigen sich häufig signifikante Unterschiede, welche nicht alleinig auf Mutationen zurückgeführt werden können.

Ein besonderes Beispiel für den horizontalen Gentransfer ist der Transfer von Genen aus endosymbiontischen Zellorganellen, welche in den Zellkern des Wirtsorganismus übergangen und dort an der Bruchstelle mittels *end-joining* in das Genom integriert wurden [23-25].

Allgemein ist der Einfluss der horizontalen Gentransfers auf höhere Organismen noch weniger erforscht als in Prokaryoten. Nichtsdestotrotz sind auch für eukaryotische Zellsysteme zahlreiche dieser Beispiele bekannt. Im Genom von Primaten sowie in dem des Menschen finden sich etwa Gene, deren Ursprung der Gentransfer aus einer prokaryotischen Spezies ist [26]. Besonders relevant für Menschen ist allerdings die Integration retroviraler DNA in das Genom. Circa acht Prozent des menschlichen Genoms können aus viralen DNA-Insertionen stammen und somit maßgeblich Einfluss auf die Zelle nehmen [27, 28].

Die genetische Vielfalt kann durch zahlreiche Prozesse generiert werden. Besonders fehlerbehaftete Mechanismen haben dabei eine bedeutende Rolle. Die Art von Versuch und Fehler (*trial and error*) trägt, wie oben beschrieben, zur langfristigen Evolution biochemischer Komponenten bei, kann aber kurzfristig auch negative Effekte im betroffenen Organismus hervorrufen. In der Folge sollen die wichtigsten Mechanismen näher beleuchtet werden.

1.2 DNA-Mutationen

Einzelne, aber stetige Mutationen der Nukleinsäure-Abfolge in codierenden Bereichen der DNA sind die treibende Kraft der Evolution von Enzymen. Durch die langsame Entwicklung der betreffenden Sequenz kommt es zu einer kontinuierlichen Selektion vermeintlich positiver Veränderungen, welche auch fortlaufend erhalten bleiben. Negative Einflüsse auf die Aktivität des Enzyms, welche eventuell auch die Fitness eines Organismus vermindern, wirken sich deutlich stärker aus. Zusätzlich wurde postuliert, dass unter bestimmten Umweltbedingungen die Mutationsrate steigt, um die Überlebenschancen durch Anpassung verbessern zu können [29].

Von Vorteil für die Weiterentwicklung ist dabei, wie bereits genannt, die degenerierte DNA-Kodierung der Aminosäuren, sodass einzelne Basenaustausche sich nicht direkt auswirken müssen, je nachdem, an welcher Stelle eines Triplets der Basenaustausch

stattfindet. Es kann zwischen (1) *missense*, (2) *nonsense*, (3) *readthrough* und (4) stillen Mutationen unterschieden werden, wenn eine Mutation (1) einen Aminosäureaustausch bewirkt, (2) zum vorzeitigen Abbruch durch Einführung eines Stopp-Codons führt, (3) durch entfallen des Stopp-Codons weitere Aminosäuren angefügt werden oder (4) die Mutation keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz hat.

Punktmutationen sind hauptsächlich auf Fehler während der Replikation der genomischen DNA zurückzuführen. Die Replikation des Genoms führt, je nach DNA-Polymerase, in einer humanen Zelle es zu einem Fehler pro 10^9 Basen [4].

Weitere Mutationen können unter anderem durch die Entstehung von Wobble-Paarungen auftreten. Dabei kommt es, auf Grund der tautomeren Verschiebung der Konformation, hin zur seltenen Enol-Form. Dadurch entstehen von der Watson-Crick-Paarung abweichende Bindungen von Thymin (Keto) – Guanin (Enol) oder Cytosin (Enol) – Adenin (Keto) [4].

In einem gewissen Maße sind natürlich vorkommende Prozesse in der Zelle, z. B. der Verlust einer Purinbase durch hydrolytische Spaltung (ca. 10.000-fach/Tag/Zelle), für Mutationen verantwortlich [30]. Deutlich größeren Einfluss haben allerdings Mutagene, die die Anzahl dieser Veränderungen erhöhen und somit für Mutationen sorgen. Von besonderer Relevanz sind dabei UV-Strahlung und die daraus resultierende Bildung von Pyrimidin-Dimeren (*cis-syn cyclobutane pyrimidine dimers*) [30, 31] sowie aus Stoffwechselwegen stammende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Radikale. Zwar gibt es in der Zelle komplexe, durch DNA-Schäden induzierte Reaktionsmechanismen (*nucleotide excision repair* (NER) und *base excision repair* (BER)), doch auch diese sind, wie die DNA-Synthese, nicht frei von Fehlern. Mittels BER werden beispielsweise Verluste von Purinbasen beseitigt. Zusätzlich kann dieses System nach Erkennen des Fehlers durch eine DNA-Glykosylase dafür sorgen, dass fehlerhafte, modifizierte Basen spezifisch abgespalten und durch korrekte ersetzt werden [30, 32]. Die Fehlerrate hier liegt bei etwa 10 bis 12 Mutationen pro 10.000 nötigen Reparaturen [33]. Wird der NER-Weg zur Reparatur der DNA aktiviert, werden größere Bereiche von Nucleotiden aus der Sequenz entfernt, anschließend durch eine Polymerase aufgefüllt und mittels Ligase wieder in den Strang eingefügt.

Bereits kleine Abweichungen können schließlich einen großen Effekt auf das entstehende Protein haben. Eine Punktmutation ist, wie bereits erwähnt, ausreichend, um ein verfrühtes Stoppen der Translationsmaschinerie zu bewirken. Zusätzlich können Mutationen in verschiedenen Bereichen der DNA auch das Spleißen der *messenger*-RNA beeinflussen. Dabei kann es zur Eliminierung von Spleißstellen bzw. Bindestellen relevanter

Komponenten des Spleißosoms kommen oder zur Einführung weiterer Spleißstellen und daraus resultierenden alternativem Spleißen [34]. Etwa zehn Prozent von Mutationen, die zu Krankheiten führen, lassen sich auf Mutationen an Spleißstellen zurückführen. Sogar Mutationen innerhalb der Intron-Sequenzen können eine Änderung des Spleißens bewirken [34].

1.2.1 *Frame-shift, Insertion, Deletion*

Im Laufe der Replikation von DNA-Strängen treten neben Punktmutationen bzw. dem Austausch einzelner Basen auch immer Fehler auf, welche vor allem die codierenden Bereiche der DNA beeinflussen. Dabei können ebenfalls fehlerhafte Reparaturmechanismen [35] oder Rekombinationsevents zur Eliminierung/Einführung einzelner oder mehrerer Nukleotide führen, was eine Verschiebung des Leserahmens (*open reading frame*; ORF) eines Gens zur Folge haben kann. *Misalignments* der Polymerasen können, je nachdem wo sich eine ungepaarte Base befindet, zur Deletion oder Insertion einer zusätzlichen Base führen [35].

1.2.2 *Replication slippage*

DNA-Polymerasen sind besonders in Bereichen mit häufigen Wiederholungen anfällig für *replication slippage*. DNA-Bereiche mit so genannten *microsatellites* sind genetisch hochvariabel, besonders in der Anzahl der Wiederholungsabfolge. Nach dem Anlagern der Polymerase wird zunächst ein Teil der DNA repliziert. Anschließend kommt es zum Anhalten und Ablösen der Maschinerie vom DNA-Strang. Der kopierte Strang löst sich vom Template-Strang, lagert sich jedoch an anderer Stelle an einem der *direct repeats* wieder an. Durch diesen Mechanismus kann es sowohl zum Auslassen, als auch zum Einfügen von *direct repeats* kommen [36, 37].

Die hierbei entstehenden Verschiebungen im Leseraster bzw. die veränderte Anzahl an kodierten Aminosäuren (besonders ganze Tripletts) können auch für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sein. Dabei stehen besonders Vervielfältigungen von Glutamin-Codons im Fokus, welche die Ursache für z. B. Chorea Huntington sind [36].

1.2.3 *Verdopplung*

Die Genverdopplung ist die Grundlage für die Entstehung paraloger Gene. Diese Dopplung tritt in allen Domänen auf und ist dabei für die Entstehung einer großen Anzahl der Gene eines Organismus verantwortlich. Etwa 30 Prozent der Gene des menschlichen Genoms

stammen aus Genduplikationen. Ähnliche Zahlen werden auch für Prokaryoten (z. B. *Mycoplasma pneumoniae*, 44 %) oder Eukaryoten (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, 30 %) aufgezeigt [19]. Der Genverdopplung geht immer die Verknüpfung zweier zuvor getrennt vorliegender DNA-Stränge voraus [38]. *Unequal crossing over* ist dabei der Mechanismus, auf Grund dessen die meisten Genverdopplungen im Genom entstehen (Abbildung 1-3). Durch eine versetzte Rekombination zweier Schwesterchromatide bzw. homologer Chromosomen kann es dabei zu einer Verdopplung von Genabschnitten, einer kompletten Gensequenz, aber auch mehrerer Gene (eines Operons) kommen [19, 38-40]. Diese Art der Rekombination benötigt ein gewisses Maß an Sequenzähnlichkeit und ist daher besonders häufig in Regionen aufzufinden, in denen *long repeats* und andere Sequenzen mit größerer Anzahl von Kopien (*copy number variants*; CNV) vorkommen [38]. Die beschriebene Rekombination ist im gleichen Maße auch für die Deletion von Genen bzw. ganzen Abschnitten in Chromosomen verantwortlich und trägt somit auch in dieser Hinsicht zur genetischen Vielfalt in Organismen bei (Abbildung 1-3).

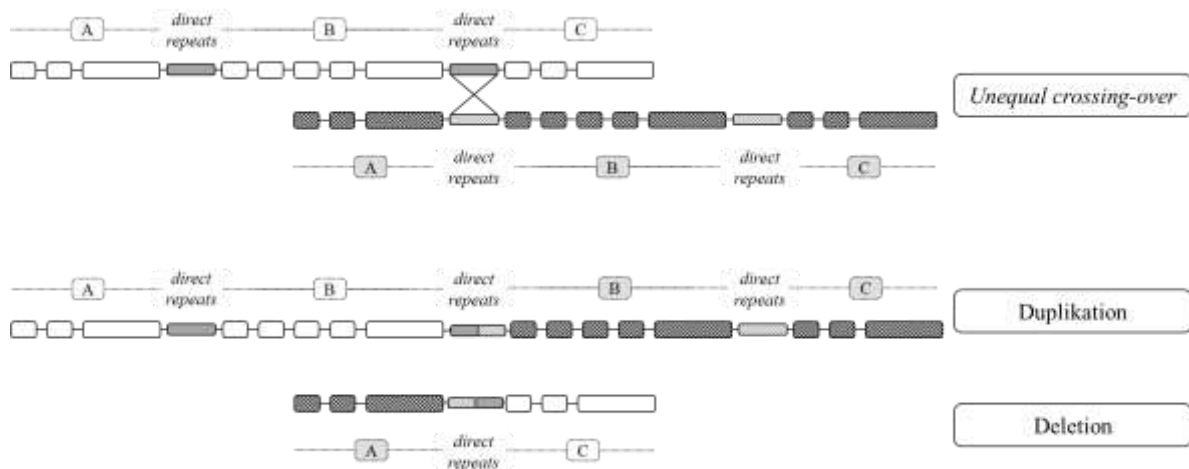


Abbildung 1-3

Durch den Mechanismus des *unequal crossing-over*, homologer Rekombination auf chromosomaler Ebene mit Sequenzähnlichkeiten, kann es im Genom zur Duplikation von Genen, Genabschnitten aber auch gesamten Bereichen kommen. Nach Hasting *et al.* [38].

Ein weiterer verbreiteter Mechanismus der Genverdopplung ist die Retroposition. Dabei werden bereits in mRNA transkribierte Gene mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend willkürlich wieder in das bestehende Chromosom, meist in der Nähe von *direct repeats*, integriert [19, 41]. Die dabei entstehende Kopie des Gens, *retrocopy* genannt, enthält dabei die mRNA-spezifische Polyadenylierung. Es fehlen allerdings die weiteren Merkmale des Ausgangsgens, wie Introns und regulatorische

Bestandteile. Für eine weitere Expression des Gens ist also der Lokus der Insertion von großer Bedeutung. Fehlen regulatorische Elemente, wird aus der integrierten Sequenz ein Pseudogen, ein nicht-funktionales Konstrukt. Wird die Sequenz jedoch *downstream* einer Promotorsequenz integriert, kann dieses Gen ebenfalls funktional abgelesen werden [19]. Relevant ist in diesem Fall besonders die reverse Transkriptase, wie sie auch von Retroviren verwendet wird. Diese wird in Säugetierzellen vermutlich von retrotransponierbaren Elementen (*long interspersed nuclear elements*, LINEs) codiert und erkennt spezifisch die Polyadenylierung der mRNA.

1.2.4 Transposons

Transposons sind variable und mobile DNA-Fragmente, die sich mittels Restriktion und Ligation (*cut/paste*) in verschiedene Bereiche des Genoms umlagern können. Dabei sind besonders Bereiche mit repetitiven Elementen betroffen. Durch diese Mobilität können Transposons genetische Veränderungen beeinflussen und sind dabei zum Großteil von weiteren Mediatoren unabhängig [42-44]. Transposons können sich durch die von ihnen kodierte Transposase in verschiedenen Stellen des Genoms integrieren und ausschneiden. Dabei wird das Transposase-Gen von terminalen *inverted repeats* (TIR) flankiert, welche zur Integration in Bereiche mit Sequenzwiederholungen (*long terminal repeats*, LTR) sowie als Erkennungssequenz zur Exzision durch die Transposase dienen [43]. Bei der Insertion eines Transposons in den DNA-Strang kommt es zur Verdopplung der Erkennungssequenz (*target site duplication*), welche beim Ausschneiden, und somit dauerhaft als so genannter *transposon footprint*, zurückbleibt [43, 44]. Neben dem Einfügen einzelner Basenpaare zeichnen sich Transposons auch für größere genetische Veränderungen verantwortlich. Duplikationen oder Deletionen sind gängig. Zudem können auch sonst nicht-mobile Elemente mit einem Transposon zusammen transloziert werden. Neben der Mutation der DNA selbst kann durch die Integration auch die Genregulation verändert werden [43, 44].

1.2.5 Viraler Gentransfer

Obwohl häufig durch intrazelluläre Prozesse verursacht, können genetische Veränderungen auch durch andere Faktoren bedingt werden. Dabei sind besonders Retroviren (wie HIV) zu nennen, die durch ihre Integration in Genome Mutationen verursachen können [4]. Sie sollen in großem Maße für Deletionen und Duplikationen von Genen verantwortlich sein. Des Weiteren entstehen durch die Integration zusätzlicher Basenpaare natürlich

Sequenzveränderungen, die *frame-shifts* oder zusätzliche Stopp-Codons verursachen, welche schlussendlich die Funktionalität des kodierten Proteins schädigen können.

1.3 Optimierung von Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen

In der heutigen Wissenschaft und Industrie können auf Grund der ständigen Weiterentwicklung auch kleine Veränderungen der Aminosäuresequenz in Enzymen einen großen Einfluss auf Anwendung und Funktion der gewünschten Reaktion haben. Dabei orientiert sich die Entwicklung moderner Biokatalysatoren an der Evolution in der Natur, sowie deren Techniken, um diese im Labormaßstab nachahmen zu können [1]. In den folgenden Abschnitten soll das Augenmerk auf die Wege für die Generierung neuer bzw. verbesserter Biokatalysatoren gelegt werden. Dabei soll auch ein Einblick in die methodischen Ansätze sowie die möglichen Effekte gegeben werden.

Als Startpunkt der Optimierung dient ein Enzym mit bekannter Sequenz, welches eine gewünschte Reaktion katalysiert bzw. katalysieren soll. Davon ausgehend kann der Optimierungsprozess begonnen werden. Zusätzlich sind für die erfolgreiche Optimierung von Biokatalysatoren funktionierende Expressionssysteme sowie sensitive und verlässliche Nachweismethoden unabdingbar, mit denen auch kleinere Differenzen unterschieden werden können [45].

1.3.1 Ziele und Wege der Sequenzoptimierung

Zu Beginn der Enzym-Optimierung steht eine Ausgangssequenz, welche mit Hilfe einer oder mehrerer Stufen von Mutationsschritten, auch Kombinationen verschiedener, verändert und anschließend per Sequenz- und Funktionsanalyse beurteilt wird. Optimierungen werden meist nötig, wenn ein Enzym für Reaktionen außerhalb des Reaktionsoptimums verwendet werden soll, bzw. die Aktivität des Enzyms verstärkt oder zu eventuellen Nebenreaktionen mit unterschiedlichen Substraten befähigt werden soll.

Prinzipiell besteht die Möglichkeit, mit einem hohen Maß an Kenntnissen der angestrebten Reaktion, ein Enzym von Grund auf zu designen, jedoch ist dies in der Praxis extrem schwierig [46]. So bedienen sich die meisten Ansätze einem bestehenden, natürlich vorliegenden Ausgangsprotein und sequenzielle Arbeitsschritte bis zum gewünschten Ergebnis.

Oftmals zielen Optimierungen auf die klassischen Eigenschaften wie Spezifität gegenüber Substraten, Aktivität, Toleranz gegenüber Salzkonzentrationen, Temperatur- und pH-Optimum, die Lösungsmittelstabilität sowie die Abhängigkeit von Co-Faktoren. Eine

vielversprechende Quelle solcher Biokatalysatoren sind extremophile Organismen, deren enzymatische Ausstattung im Laufe der Evolution an ihre extremen Lebensräume angepasst wurde.

Vielversprechende natürliche Vorläufer finden sich besonders für Optimierungen der Substratspezifität [47]. In vielen Fällen haben nahverwandte Enzyme (siehe 1.1.2) leicht unterschiedliche Eigenschaften die Reaktionsbedingungen betreffend sowie eventuelle Nebenaktivitäten für interessante Substrate [46]. Die Promiskuität eines Enzyms gilt als Indikator der Optimierbarkeit [1, 46]. Erfahrungen zeigten, dass bereits vorhandene Nebenaktivitäten bzw. Spezifitäten oft erfolgreich verstärkt werden konnten [5, 48]. Andererseits muss eine Ähnlichkeit des Reaktionsmechanismus für zwei Substrate keine Garantie für eine erfolgreiche Anpassung der Enzymaktivität bedeuten.

1.3.2 Sequenzbasierter Ansatz – Suche nach natürlich vorkommenden Vorlagen

Die Suche nach ähnlichen, also homologen, Gensequenzen kann als erster Optimierungsschritt in Betracht gezogen werden. Ein Screening nach gewünschten Aktivitäten in verwandten Organismen hilft dabei, eine Vorauswahl zu treffen. Anschließend kann durch eventuelle konservierte Bereiche mit Hilfe einer PCR das codierende Gen amplifiziert werden. Die generierten Sequenzen können exprimiert und die resultierenden Enzyme auf Aktivität getestet werden. Je nach Eignung würden sie als Ausgangspunkt für weiterführende Optimierungsschritte dienen [1]. In der Natur vorkommende Gene können auch als Ausgangspunkte für DNA-*shuffling* dienen, indem mehrere homologe Gene miteinander kombiniert werden [49].

Eine besondere Quelle zur Nutzung von homologen Enzymen stellen extremophile Organismen dar. Diese zeichnen sich durch eine hochspezialisierte biochemische Ausstattung aus, welche es ihnen ermöglicht, auch in biologischen Nischen zu überleben, die für einen Großteil aller Organismen als unwirtlich gelten [48, 50]. Bei der Suche nach neuen Biokatalysatoren (*bioprospecting*), die auch extremen Reaktionsbedingungen in industriellen Prozessen standhalten, wurde angenommen, dass die Reaktionsoptima von Enzymen den Wachstumsbedingungen des jeweiligen Organismus ähnelten [51-54]. Extremophile finden sich unter anderem in besonders heißen (thermophil) oder kalten (psychrophil), aber auch in salzreichen (halophil) bzw. basischen (alkaliphil) und sauren (acidophil) Milieus [54]. Besonders für Waschmittelanwendungen werden Enzyme mit einer Toleranz gegenüber hohen Temperaturen und pH-Werten benötigt (Peptidasen),

wohingegen in der Lebensmittelindustrie die Anwendungen eher bei niedrigen Temperaturen und pH-Werten ablaufen sollen (Lipasen, Amylasen) [52].

Das industrielle Interesse und die Suche nach extremophilen Enzymen führten schließlich auch zur Entdeckung weiterer neuer Enzyme sowie der Identifikation molekularer Ursachen für die extreme Stabilität. Sequenzen und 3D-Modelle thermophiler Enzyme wurden mit mesophilen Homologen verglichen, wodurch im Falle besonders hitzebeständiger Enzyme gezeigt werden konnte, dass diese sich durch ein erhöhtes Aufkommen geladener Aminosäuren und einer erhöhte Hydrophobizität im Inneren abheben [52]. Dadurch werden vermehrt Ionenpaarungen geschaffen, um die Oberfläche zu stabilisieren [50]. Zusätzlich sind oftmals thermolabile Aminosäuren, wie Gln, Asn, Asp, Cys, an der Oberfläche ausgetauscht [55, 56] oder ins Innere gefaltet [50]. Die Optimierung der Interaktion an der Grenzschicht von Protein zu Umgebung ist ein wichtiges Kriterium in vielen extremophilen Proteinen [50]. Extrazelluläre Proteine halophiler Organismen weisen eine große Anzahl negativ geladener Reste auf der Proteinoberfläche auf [52, 56].

Verallgemeinert kann gesagt werden, dass viele dieser besonderen Enzyme eine für die jeweiligen Bedingungen optimierte Oberfläche, oftmals mit geladenen Aminosäuren, besitzen. Des Weiteren fällt eine kompaktere Struktur aus kleineren Loops und Kavitäten im Proteininneren auf, was zu einem kleineren Verhältnis von Oberfläche zu Volumen führt und sich vermutlich stabilisierend auf das Gesamtprotein auswirkt [50].

Ein großes Problem dieser Art von Enzymen ist, dass diese meist nicht in geeignetem Maßstab im Fermenter produziert werden können, was nicht zuletzt an den extremen Wachstumsbedingungen der Organismen bzw. der schlechten Kultivierbarkeit und dem schwierigen Zugang zu geeigneten Quellen für die Organismen liegt [51]. Abhilfe schaffen dabei immer öfter genombasierte Ansätze [53], bei denen zuerst Genbanken aus Proben erstellt, sequenziert und anschließend über bioinformatische Sequenzvergleiche (oder PCR-Ansätze mit konservierten Primern) Homologe zu bereits bekannten Genen gefunden werden sollen. Identifizierte Gene werden anschließend in heterologen Wirten exprimiert [52, 57]. Proteine aus extremophilen Organismen liefern, wie oben beschrieben, Anhaltspunkte für die Einflüsse auf die Enzymstabilität [57], welche später in der gezielten Weiterentwicklung hilfreich sein können. Außerdem sind die Gene der Extremophilen selbst oftmals Ausgangspunkte für weitere Optimierungsschritte, da in vielen Fällen die Aktivität und Produktivität des Enzyms mittels *protein engineering* noch gesteigert werden kann und muss [51, 52].

1.3.3 *Random Mutagenesis/Directed Evolution*

Die vorhandene Gensequenz kann mittels verschiedener unspezifischer Methoden (*error-prone* PCR, DNA *shuffling*, etc.) mutiert werden, um anschließend die Genprodukte in einem großen Screening zu evaluieren. Dabei können positive Klone identifiziert und weiter optimiert werden. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass keine vorherigen Kenntnisse über das Gen bzw. Protein vorhanden sein müssen. Die Herausforderung besteht hierbei in der Bewältigung der enormen Anzahl von Variablen und entstehenden Klonen [1]. *Directed Evolution* ist eine lang etablierte Vorgehensweise für die Optimierung von Biokatalysatoren. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung dieser Vorgehensweise ist eine Screening-Methode bzw. ein Assay, welche die Analyse im hohen Durchsatz ermöglicht, wie etwa *phage display* oder *yeast surface display* [58, 59].

1.3.4 *Rational Protein Design*

Eine gerichtete (Weiter-)Entwicklung eines Enzyms und dessen codierender Sequenz setzt ein großes Maß an Wissen über Struktur und Faltung des Proteins voraus. Durch immer größer werdende Datenbanken gewinnt dieser Ansatz stetig mehr Bedeutung. Die *genome revolution* ermöglicht eine präzisere Vorhersage von Funktion und Struktur eines Enzyms [17]. Gezielte Aminosäureaustausche bzw. Sequenzen an Aminosäureaustauschen verringern die Probenanzahl der zu screenenden Klone und geben in der Folge Aufschluss über die Einflüsse der jeweiligen Aminosäuren im Protein. Nach wie vor ist es ein Nachteil des *rational design*, dass sich die Aufmerksamkeit vor allem den Aminosäuren nahe des aktiven Zentrums eines Enzyms widmet. Allerdings zeigten Studien bereits größere Effekte weiter entfernter Aminosäuren. Diese Voreingenommenheit verringert sich mit den anwachsenden Datenbanken und dem Wissen über Strukturveränderungen durch definierte Aminosäureaustausche [60]. Eine zielgerichtete Entwicklung von Biokatalysatoren ist nur mit Hilfe fundierter Kenntnisse über den Einfluss verschiedener Aminosäureaustausche und deren Konsequenzen für das gesamte Protein möglich. Durch die stetig anwachsenden Protein-Datenbanken erfährt dieses Wissen konstante Erweiterung. Im Labor veränderte Proteine tragen ebenfalls zum Kenntnissgewinn bei, indem zuvor willkürlich Aminosäuren ausgetauscht und anschließend die Folgen für die Struktur und die Funktion des Enzyms untersucht werden [49].

Von besonderer Wichtigkeit sind, wie bereits erwähnt, industrielle Anwendungen, die, auf Grund der teilweise harschen Reaktionsbedingungen, eine große Herausforderung für enzymatisch katalysierte Prozesse darstellen. Eine gezielte Anpassung ist daher ein Weg,

um ein bereits vorhandenes Enzym mit wenigen Aminosäureaustauschen zu optimieren. In der Folge sollen einige Beispiele für die Anpassung von Enzymen bezüglich industriell relevanter Parameter erläutert werden.

1.3.4.1 Thermostabilität/-aktivität

In Lebensmittelanwendungen, in Waschzusätzen oder in der Papierbleichung [50] sind Temperaturen jenseits der Optima von Enzymen mesophiler Organismen ($> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) notwendig. Dabei wird die Eignung des Enzyms davon bestimmt, dass es einerseits bei höheren Reaktionstemperaturen katalytisch aktiv und andererseits in der Lage ist eventuelle Zwischenschritte mit erhöhten Inkubationstemperaturen zu überstehen. Die Erhöhung der Temperatur während eines Prozesses kann, unter anderem, durch die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Verringerung potenzieller Kontaminationen von Vorteil sein, weshalb besonders dieses Charakteristikum industriell von großer Bedeutung ist.

Durch die intensive Forschung im Bereich der thermophilen ($45\text{--}85\text{ }^{\circ}\text{C}$) und hyperthermophilen ($> 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) Enzyme [50] konnten wichtige Faktoren für diese Temperaturstabilität aufgeklärt werden. Dabei spielten auch Vergleiche von Sequenzen und Faltungen homologer Enzyme, wie mesophiler und thermophiler Vertreter der Subtilisine, eine große Rolle.

Die Optimierung der Aminosäuresequenz bezüglich thermodynamischer Stabilität ist dabei essentiell. Es geht darum, die Entfaltung (Denaturierung) des Enzyms zu verringern, was durch eine Senkung der Entropie des entfalteten Zustands zu erreichen ist [49]. Dazu können vermehrt Proline in das Protein integriert werden. Zudem können kovalente Cystein-Brücken helfen, das Protein zu stabilisieren. Allerdings gibt es gegenläufige Ansichten zu Cystein, da es bei hohen Temperaturen zum oxidativen Abbau und damit zu Inaktivierung des Enzyms kommen kann. Andererseits konnte in extremophilen Enzymen gezeigt werden, dass mehr als 10 % der vorhandenen Cysteine an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind [54]. Prinzipiell gilt es, die Mobilität der Enzyme zu verringern, sodass hohe Temperaturen allein nicht zur Denaturierung führen. So können bestehende α -Helices verbessert bzw. stabilisiert werden, indem vermehrt Alanin eingefügt wird [49]. Stabilere Enzyme sind in der Regel kompakter, mit kleineren Poren im Kern des Proteins. Dabei verringert sich auch die Größe von Strukturen, die aus dem Protein herausragen, umso weniger „Angriffsfläche“ zu bieten (Abbildung 1-4) [54]. Es wurde festgestellt, dass thermophile Enzyme auf Grund dieser strukturellen Besonderheiten auch

gegenüber anderen Einflüssen, wie Lösungsmitteln oder Abbau durch Peptidasen, stabiler sind [61, 62].

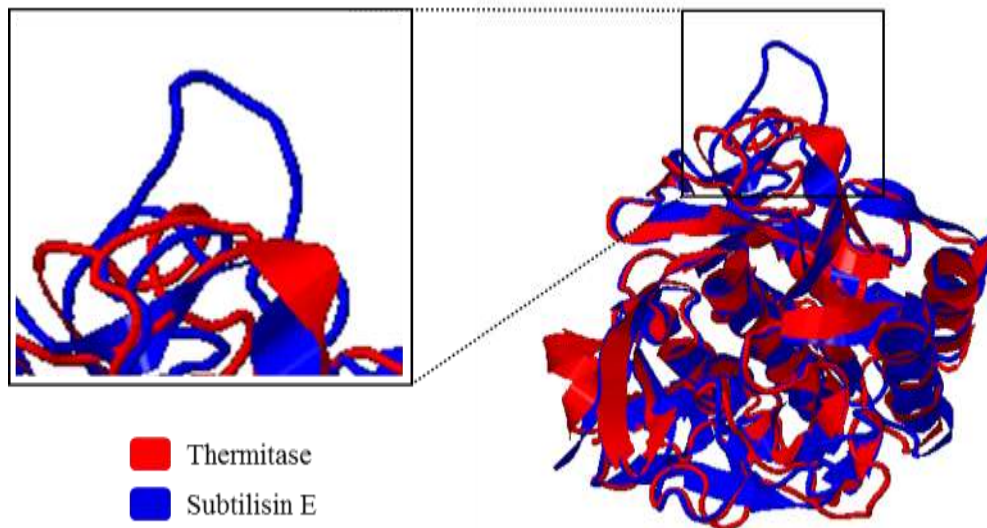


Abbildung 1-4

Vergleich der 3D-Modelle des mesophilen Subtilisin E (UniProt P04189; blau) und der thermophilen Thermitase (UniProt P01501; rot). Beide Proteine sind sich strukturell ähnlich, allerdings zeigen sich, wie im hervorgehobenen Bereich, strukturelle Unterschiede, welche auch in Zusammenhang mit verbesserter Stabilität eines Enzyms stehen können.

Die Optimierung des Temperaturverhaltens eines Enzyms ist dennoch nicht trivial. Es zeigte sich bei Sequenzvergleichen zwischen dem mesophilen Subtilisin E (275 AS) und der thermophilen Thermitase (279 AS), dass sich beide Enzyme in 157 Aminosäuren unterschieden [62]. Untersuchungen mit verändertem Subtilisin E belegten allerdings, dass nur acht Änderungen in der Sequenz des Enzyms ausreichend waren, um seine Eigenschaften der Thermitase anzugleichen [62]. Dabei traten nur zwei der Veränderungen auch so in der Sequenz des nativen thermophilen Enzyms auf.

Der Vergleich von Kälte-Schock-Proteinen aus *Bacillus spec.* ergab, dass ein thermophiles Protein sich vom mesophilen Homolog nur in zwölf Aminosäuren unterschied, von denen allerdings nur zwei, in separater Betrachtung, einen wirklichen Einfluss auf das Temperaturverhalten des Enzyms hatten [49, 54].

Zieht man diese Ergebnisse in Betracht, gibt es meist nicht nur einen richtigen Weg zu einem temperaturstabileren Enzym, sondern eher eine Reihe individueller

Mutationsmöglichkeiten, die durch additive Effekte zur Stabilisierung beitragen (Tabelle 1-1) [49].

Psychrophile Enzyme gewinnen an Bedeutung. Das Einsparen von Energie geht in Produktionsprozessen oft zuerst mit der Verringerung der nötigen Temperatur der Prozesse einher. So werden in modernen Waschanwendungen Peptidasen benötigt, welche auch bei Temperaturen unter 20 °C sehr aktiv sind. Im Kontrast zu thermophilen Enzymen benötigen diese Enzyme eine erhöhte Flexibilität, welche sich vor allem durch eine Ansammlung polarer Reste im inneren des Proteins erreichen lässt. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen wird vermindert und somit eine größere Beweglichkeit gewährleistet. Zudem wird die Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen reduziert [54].

Tabelle 1-1

Beispiele für die Anpassung von Enzymen bezüglich ihrer Thermostabilität bzw. Temperaturoptima. Dabei entspricht $t_{1/2}$ der Zeit, nach der noch 50 % der anfänglichen Aktivität messbar waren und T_{50} der Temperatur, bei der noch 50 % der anfänglichen Aktivität gemessen wurden.

Enzym	Methode	Aminosäure-austausche	Effekt	Quelle
α -Amylase	<i>site-directed mutagenesis</i>	1 (Asn190Phe)	6-fach $t_{1/2}$ bei 80 °C	[63]
Endoglucanase	<i>site-directed mutagenesis</i>	1 (Ala35Val)	t_{opt} 7,7 °C erhöht	[64, 65]
Glucose-Isomerase	<i>site-directed mutagenesis</i>	1 (Trp15Arg)	1,6-fach $t_{1/2}$ bei 85 °C	[66]
Lipase B	<i>error-prone PCR</i>	3	> 20-fach $t_{1/2}$ bei 70 °C	[67]
Peroxidase	<i>site-directed mutagenesis</i>	7	124-fach $t_{1/2}$ bei 40°C	[68]
Subtilisin BPN	<i>random and site-directed mutagenesis</i>	6	> 300-fach $t_{1/2}$ bei 65 °C	[69, 70]
Subtilisin E	<i>random mutagenesis</i>	8	200-fach $t_{1/2}$ bei 65 °C T_{50} 17 °C erhöht	[71]

1.3.4.2 pH-Stabilität

Die Stabilität bzw. Aktivität eines Enzyms kann durch wechselnde pH-Werte der umgebenden Lösung stark beeinflusst werden. Zumeist bestehen Interaktionen zwischen Enzym und Substrat aus einem fein abgestimmten Prozess zwischen verschiedenen geladenen/polaren funktionellen Gruppen. Am Beispiel von Subtilisin wird dies besonders deutlich, da im Fall einer sauren Umgebung das Histidin in protonierter Form vorliegt,

wodurch das Enzym inaktiviert wird [72]. Die Anpassung an pH-Werte abseits des neutralen Milieus erfolgt hauptsächlich durch eine Ladungsanpassung auf der Oberfläche des gefalteten Proteins [72, 73]. Alkalophile Enzyme besitzen eine größere Anzahl negativ geladener Aminosäuren [74]. Das *protein engineering* ermöglicht mit Hilfe der Anpassung weniger Aminosäuren das Verschieben des optimalen pH-Bereiches [72], jedoch keine Umkehr von pH-Präferenzen (Tabelle 1-2). Die Effekte der verschiedenen Austausche sind dabei kumulativ und wirken sich auch über größere Entfernung zum aktiven Zentrum über Ladungsaustausche auf katalytisch relevante Aminosäuren aus [72]. Generell ist es zu vermeiden, dass es auf Grund veränderter Ladungen nahe des aktiven Zentrums zu einer Akkumulation der Gegenionen des Puffers kommt. Auch diese können zur Inaktivierung des Enzyms führen bzw. mit der Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes interferieren [72].

Tabelle 1-2

Beispiele für die Anpassung von Enzymen bezüglich ihrer pH-Stabilität bzw. pH-Optima. Dabei entspricht $t_{1/2}$ der Zeit, nach der noch 50 % der anfänglichen Aktivität messbar waren und pH_{opt} dem pH-Wert, der in der höchsten gemessenen Enzymaktivität resultierte.

Enzym	Methode	Aminosäure-austausche	Effekt	Quelle
Glucoamylase	<i>site-directed mutagenesis</i>	1 (Ser411Ala)	$pH_{opt} + 0,8$	[75]
Penicillin-Acylase		1 (Asp484Asn)	9-fach $t_{1/2}$ bei pH 10	[76]
Phytase		2	$pH_{opt} - 0,5 / - 1$	[77]
Xylanase		5	$pH_{opt} + 0,4$	[74]
α -Amylase		6	3,5-fach $t_{1/2}$ bei pH 4,85	[73]

Allgemein gilt, dass Enzyme, welche extremen Bedingungen widerstehen, eine Vielzahl hydrophober Wechselwirkungen eingehen. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, die Anzahl von Aminosäuren wie Phenylalanin, Isoleucin und Valin zu erhöhen. Asparagin- und Glutamin-Reste sind unter bestimmten Bedingungen anfällig für die Deaminierung durch Serin und Threonin [54]. Diese bevorzugte Verwendung eher unpolarer Aminosäuren ist bei extremophilen Organismen genomisch optimiert worden [54].

An der Grenzschicht zwischen Protein und Lösungsmittel hingegen kommt es auf eine optimierte Ladung der Oberfläche an. Die Interaktion geladener Seitenketten mit der Umgebung trägt maßgeblich zur Aktivität, aber vor allem Stabilität eines Proteins bei [78].

1.3.4.3 Enantioselektivität/Substratspezifität

Wirtschaftlich von besonders großem Interesse ist die Synthese enantiomerenreiner Chemikalien in der pharmazeutischen Industrie und zur Herstellung von Feinchemikalien. Nicht erst seit Contergan ist bekannt, dass Moleküle verschiedener Chiralität auch unterschiedliche Wirkungen im menschlichen Körper haben können. Die chemische Synthese zeigt oft nicht nur in Bezug auf Umweltaspekte, sondern auch durch die mögliche Entstehung eines Enantiomerengemisches Nachteile auf. Enzyme hingegen sind oftmals in der Lage, eine bestimmte Form des Stoffes spezifisch bzw. bevorzugt zu produzieren oder umzusetzen [79]. Da nicht immer für jede gewünschte Reaktion ein passendes Enzym bereitsteht, wurde versucht, vorhandene Biokatalysatoren hinsichtlich ihrer Präferenz gegenüber der Enantiomerie des Produktes zu optimieren. So konnte am Beispiel von Esterasen aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden, dass eine Umkehr der bevorzugten *R*-Enantiomere eines acetylierten tertiären Alkohols hin zum *S*-Enantiomer möglich ist [80].

Eine Anpassung eines vorhandenen Enzyms ist auch hinsichtlich der Substratspezifität möglich (Tabelle 1-3). Dabei kann die Aktivität gegenüber Substraten verbessert werden, die von Enzymen weniger akzeptiert werden. Am Beispiel der bekannten *Taq*-Polymerase wurde gezeigt, dass schon mit geringstem Aufwand, dem gezielten Austausch einer Aminosäure, unnatürliche Nucleotide in die DNA eingebaut wurden [2].

In beiden Fällen der Anpassung eines Enzyms, sowohl bezüglich der Enantioselektivität als auch der Substratspezifität, liegt das Augenmerk auf der Optimierung des aktiven Zentrums sowie dem Substratkanal dorthin [2, 60]. Oft sind bereits wenige Austausche von Aminosäuren ausreichend, um große Effekte zu erwirken. Die sterische Behinderung durch größere Aminosäurereste kann ein Vordringen von Substratmolekülen hin zum aktiven Zentrum verhindern [81]. Zudem können auch Austausche von weiter entfernten Aminosäuren Effekte erzielen, indem die Allosterie des Enzyms induziert wird und somit die Möglichkeit vorliegt, dass sich das Protein auch an andere Bindungspartner in aktiven Zentrum anpasst [2].

Tabelle 1-3

Beispiele für die Anpassung von Enzymen bezüglich ihrer Substrat- bzw. Produktspezifitäten. Bereits mit geringen Änderungen der Aminosäuresequenz lassen sich teilweise große Unterschiede in der Enzymkatalyse hervorrufen.

Enzym	Methode	Aminosäure-austausche	Effekt	Quelle
Desaturase	<i>site-directed mutagenesis</i>	5	Substrate mit größerer Kettenlänge akzeptiert	[81]
Esterase		2	Umkehr der Enantioselektivität ($R \rightarrow S$)	[80]
Meerrettich-Peroxidase		1 (Phe41Leu)	35-fach erhöhte Enantioselektivität	[60]
Subtilisin BPN		1 (Tyr217Leu)	synthetische Substrate akzeptiert	[82]
Taq-Polymerase		1 (Leu616Ala)	akzeptiert synthetische dNTPs	[83]

1.3.4.4 Weitere Optimierungsansätze

Neben dem Austausch nur weniger Aminosäuren im jeweiligen Enzym gibt es auch Ansätze, welche mit Hilfe größerer Veränderungen zu einer verbesserten Applikation von Biokatalysatoren führen können. So wurden z. B. Lipasen gezielt am *lid* verändert, welcher das aktive Zentrum verschließt [84], um so eine Aktivitätserhöhung zu erreichen.

Dabei besteht die Möglichkeit, gezielt größere Teile bzw. Module eines Proteins zu entfernen. Im Fall von Zhang *et al.* [85], lieferte eine *N*-terminal gekürzte Lipoxygenase deutlich erhöhte Aktivitäten im Vergleich zum nativen Enzym.

Andererseits ist es aber auch von Vorteil, Fusions-Proteine mit einem „Löslichkeitsvermittler“ zu produzieren. Besonders für *Escherichia coli*, einem Expressionswirt welcher oft zur Produktion von unlöslichen Enzymen in *inclusion bodies* führt, zeigte sich, dass eine Kopplung von sehr gut löslichen Proteinen mit einem schwerlöslichen Zielenzym erfolgversprechend sein kann [86].

Abseits der molekularbiologischen Methoden wird vor allem in industriellen Anwendungen oft auf die Immobilisierung von Enzymen gesetzt, z.B. auf Silica-Partikeln immobilisierte Enzyme in Reinigungsmitteln [87]. Die Enzyme können mit Hilfe verschiedener Immobilisierungsmethoden vor der Inaktivierung geschützt, aber auch im Laufe des Prozesses leichter vom Reaktionsansatz getrennt und somit länger verwendet werden [87].

1.4 Basidiomycota als Enzymquelle

Das Phylum der Basidiomycota (Ständerpilze) beinhaltet etwa 30.000 Organismen mit außergewöhnlicher enzymatischer Ausstattung [88]. Sie sind zumeist saprotroph, d. h. sie sind auf organisches Material als Hauptnährstoffquelle angewiesen. Basidiomycota sind dabei auf allen Kontinenten verbreitet und spielen eine wichtige Rolle im Abbau von pflanzlicher Biomasse. So sind Braunfäule- und Weißfäule-Pilze für Holzabbau verantwortlich, um Bestandteile wie Cellulose oder Lignin als Energiequelle nutzbar zu machen. Insbesondere durch die Sekretion extrazellulärer Enzyme, hauptsächlich Oxidoreduktasen, sind sie in der Lage, diese oft schwer zugänglichen Polymere für sich zu gewinnen.

Die Gattung *Pleurotus* (Seitlinge) ist wirtschaftlich eine der wichtigsten innerhalb der Basidiomycota. Die zugehörigen Spezies weisen einen hohen Nährwert auf, sind weltweit verbreitet und gehören zu den meist kultivierten Speisepilzen [89, 90]. Zusätzlich werden im Zusammenhang mit *Pleurotus* spec. eine Vielzahl medizinischer Wirkungen beschrieben [90]. Auf Grund der vergleichsweise einfachen Kultivierbarkeit der Vertreter dieser Gattung fanden sich weitere industrielle Anwendungen, wie z. B. in der Altlastensanierung im Boden (*bioremediation*) oder der Verwertung von Nebenströmen aus der Landwirtschaft [90].

1.4.1 Genetische Vielfalt

Die Vertreter der *Pleurotus* spec. zeichnen sich durch eine hohe genetische Variabilität innerhalb ihrer Populationen aus. Insgesamt gehören elf bzw. fünfzehn Spezies, je nach Quelle, zur Gattung *Pleurotus* [90-92]. Dabei können die genetischen Variationen innerhalb der Population eines Standortes größer sein, als im Vergleich zu Organismen einer weiter entfernten Population [89, 92]. Zur genetischen Variabilität können außerdem geografische Effekte durch Anpassung an Standorte beitragen.

In vielen Fällen konnte die Bildung von Isoenzymen nachgewiesen werden. Einige relevante Enzyme sind demnach durch verschiedene Gene kodiert. Es finden sich fünf Peroxidase- und fünf Laccase-Gene im Genom von *P. ostreatus*, sowie vier Laccase-Gene in *P. sajor-caju* [48]. Bei einer Suche im Genom von *Pleurotus ostreatus* (PC15 V. 2; Suchwort „laccase“; Joint Genome Institute [93]) fanden sich sieben verschiedene Laccase-Gene, deren kodierte Enzyme zwischen 33 % und 97 % Übereinstimmungen auf Aminosäureebene aufwiesen. Eine Suche nach Lipoxygenasen resultiert in zwei Enzymen mit einer Übereinstimmung von ca. 73 % der Aminosäuren. Des Weiteren können mittels

eines Blastp mit der Sequenz von PPP1 (ENA *accession number* LN87829) vier Subtilisin-ähnliche Peptidase-Gene identifiziert werden. Die resultierenden Enzyme hatten Übereinstimmungen zwischen 37 % und 60 % der Aminosäuren. Die genetische Variabilität sowie das mehrfache Vorhandensein von Genen für Isoenzyme unterstreichen das Potenzial dieser Organismen als Enzymquelle.

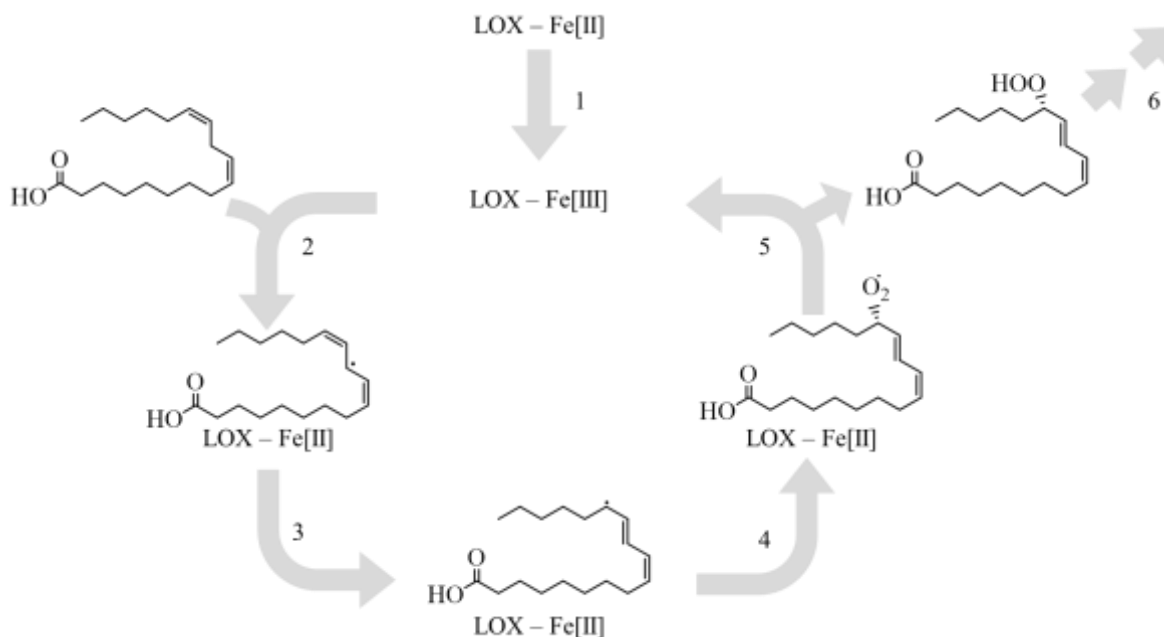
1.4.2 Untersuchte Enzymklassen

1.4.2.1 Lipoxxygenasen

Lipoxxygenasen (LOX; EC 1.13.11.x), Nicht-Häm-Eisen-haltigen Oxidoreduktasen, sind ubiquitär vorkommende Enzyme, deren Bedeutung sich über verschiedene Bereiche der zellulären Regulation erstreckt. Sie katalysieren die Insertion von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die ein 1Z,4Z-Pentadiensystem beinhalten (Abbildung 1-5), wie z. B. Arachidon- oder Linolsäure als Hauptbestandteile in biologischen Membranen. Dabei entstehen hoch-reaktive Hydroperoxide, die sowohl für die autokatalytische Aktivierung weiterer Lipoxxygenasen verantwortlich sind, als auch durch den späteren Zerfall weitere Moleküle oxidativ verändern können. Die Lipoxxygenase-katalysierten Reaktionsprodukte spielen insbesondere als oxidative Mediatoren in der Signaltransduktion (Leukotriene) eine Rolle [94]. Des Weiteren können Lipoxxygenasen auch im Zuge der Zellabwehr und im programmierten Zelltod aktiviert werden um die Signaltransduktion einzuleiten bzw. Membranbestandteile eventueller Pathogene abzubauen [95]. Vornehmlich steht die Synthese von Oxylipinen im Fokus, welche allergische und entzündliche Reaktionen im Organismus vermitteln.

Von großem industriellem Interesse sind Lipoxxygenasen auf Grund der bei Zellverletzung initiierten Synthese verschiedener C6-Alkohole und -Aldehyde, welche als „Grüne Duftstoffe“ beschrieben werden [96] und dementsprechend vor allem in der Herstellung natürlicher Aromen (Verordnung (EG) Nr. 1334/2008) gefragt sind.

Zusätzlich zu diesen bereits bekannten Lipoxxygenase-vermittelten Aromastoffsynthesen wurden in den letzten Jahren vermehrt Untersuchungen zur enzymatischen Synthese weiterer Aromastoffe unternommen. Speziell die vollständig charakterisierte Lipoxxygenase 1 aus Soja (*Glycine max* L.) wurde auf Grund der günstigen Verfügbarkeit und Aktivität gegenüber beiden Standardsubstraten (Linolsäure und Arachidonsäure) häufig verwendet. Neben diesem Modell-Enzym wurde auch eine Lipoxxygenase aus *Pleurotus sapidus* bezüglich ihres Potenzials für die Nootkaton-Biosynthese untersucht [97, 98].

**Abbildung 1-5**

Schematische Darstellung der Lipxygenase-Reaktion anhand des Substrates Linolsäure [99]. (1) Autokatalytische Aktivierung des prostetischen Eisen-Ions Fe[III], ggf. durch bereits vorhandene Hydroperoxide. (2) Abstraktion des Wasserstoffes in bis-allylischer Position unter Freiwerden eines Elektrons. (3) Mesomeriestabilisierung des Pentadienylradikals unter Ausbildung eines konjugierten Systems. (4) Insertion von molekularem Sauerstoff, Ausbildung eines Peroxyradikals. (5) Radikalreduktion und Ausbildung des Linolsäurehydroperoxids unter Zurückgewinnung des aktiven Enzyms (6) Weiterreaktion der reaktiven Hydroperoxide als „Oxidationsmediator“. Nach Ivanov *et al.* [99].

Das Potenzial von Oxidoreduktasen bezüglich der Biotransformationen von Naturstoffen ist bekannt und auch die Lipxygenasen wurden hinsichtlich dieser Eigenschaft erforscht. Im Laufe der Arbeit stand die Oxidation von Valencen zu Nootkaton im Vordergrund und diente als Modellreaktion.

1.4.2.2 Peptidasen

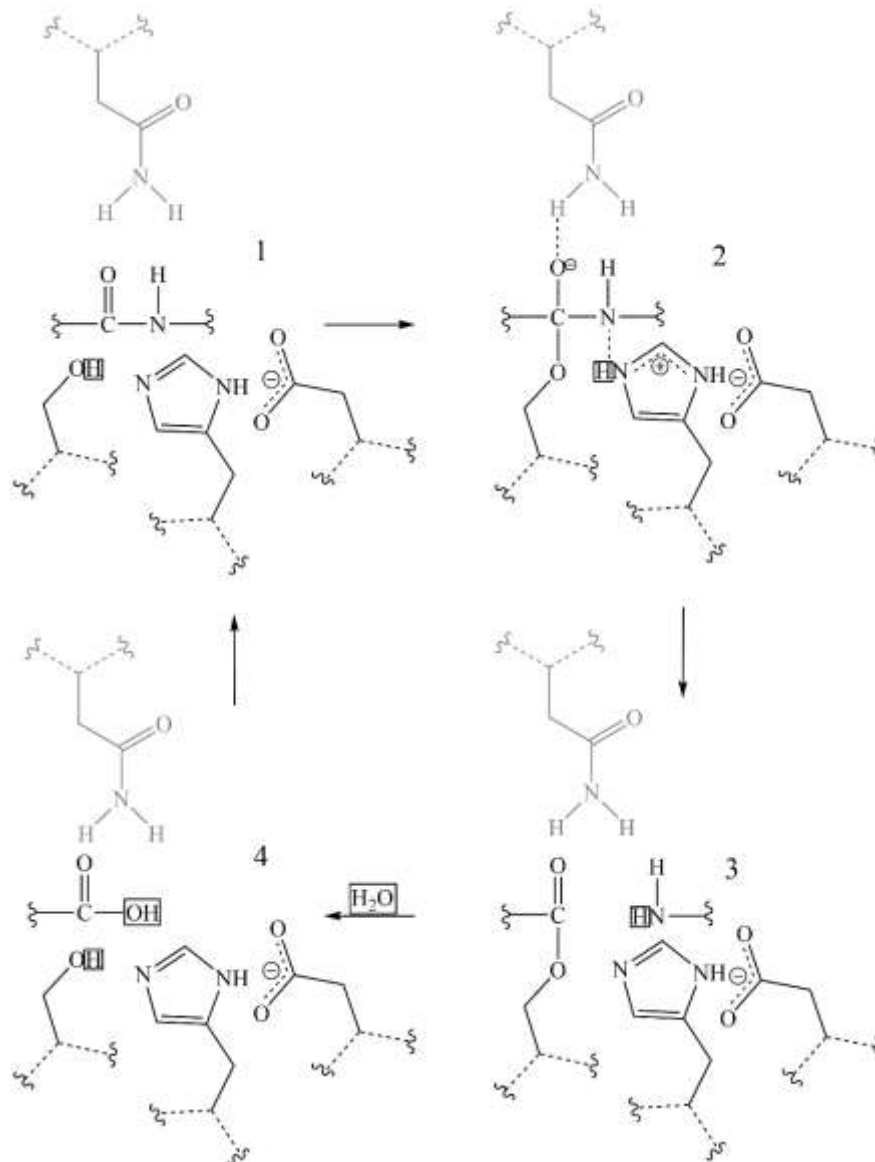
Peptidasen/Proteasen (EC 3.4.x.x) sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Diese essentielle Reaktion ist Domänen-übergreifend in allen lebenden Zellen anzutreffen, ob in Signaltransduktionswegen, während der Apoptose, der Prozessierung von Proteinen nach der Translation oder zur Verfügbarmachung von Aminosäuren und Peptiden für den gesamten Zellmetabolismus.

Peptidasen sind vielfältig in ihren Sequenzen, wobei sich im menschlichen Genom etwa 500 codierende Gene finden [100]. Auch auf Proteinebene stellen Peptidasen die zahlenmäßig größte Fraktion dar. Abhängig vom Zustand der Zelle können sie bis zu 2 % des Gesamtproteins ausmachen [100].

Peptidasen werden anhand ihrer katalytischen Eigenschaften sowie der verantwortlichen Aminosäuren und funktionellen Gruppen klassifiziert [101]. So können z. B. durch die verschiedenen Angriffspunkte im Protein Amino- oder Carboxypeptidasen unterschieden werden. Zusätzlich ist auch die Größe der freigesetzten Peptide relevant. Es können sowohl einzelne Aminosäuren als auch Di-, Tri- oder Polypeptide abgespalten werden. Ein Hauptunterschied der Peptidasen liegt im Vorhandensein und der Reihenfolge der katalytischen Triade, in der verschiedene Aminosäuren (Serin, Cystein, Asparaginsäure) die Hydrolyse der Peptidbindung vermitteln.

Die größte Gruppe innerhalb der proteolytischen Enzyme stellen Serin-Proteasen dar. Sie umfassen rund ein Drittel der bekannten Peptidasen [102]. Besonders Trypsin und Subtilisin sind wichtige Modellenzyme, die seit langer Zeit tiefgehend beforscht wurden.

Sowohl in Trypsin als auch Subtilisin besteht die katalytische Triade aus den Aminosäuren Histidin, Asparagin und Serin (Abbildung 1-6), jedoch in unterschiedlicher Reihenfolge. Dadurch werden die beiden Enzyme unterschiedlichen Clans der Serin-Proteasen zugeordnet (Trypsin – Clan PA; Subtilisin – Clan SB) [100, 102]. Subtilisin ist eine Serin-Peptidase, die ursprünglich in *Bacillus subtilis* identifiziert wurde. Subtilisin-ähnliche Peptidasen (Subtilasen) sind demnach Enzyme, deren katalytischer Zyklus sowie Struktur ähnlich des Subtilisins (mehrere α -Helices sowie β -Faltblätter) sind [103, 104]. Subtilasen finden sich nicht nur in prokaryotischen Organismen, sondern auch in Eukaryoten wie z. B. den Basidiomyceten.

**Abbildung 1-6**

Katalytische Triade einer Subtilase. Im ersten Schritt wird ein Proton von Ser auf His übertragen, wodurch der nucleophile Angriff auf die Peptidbindung ermöglicht wird (1). Es kommt zur Ausbildung der tetraedrischen Zwischenstufe, welche auch durch Asn (Oxyanionlücke) stabilisiert wird (2). Anschließend folgt die Übertragung des Protons auf den Stickstoff in der Peptidbindung, wodurch diese gespalten wird (3). Letztlich greift ein Wasser-Molekül nucleophil an, wodurch auch die kovalente Bindung des Carbonylkohlenstoffs zum Serin gespalten wird (4). Nachdem die Spaltprodukte aus dem aktiven Zentrum diffundiert sind, kann eine erneute Reaktion stattfinden. Adaptiert nach Carter und Wells, 1988 [105].

Wirtschaftlich sind Subtilisin bzw. Subtilasen, vornehmlich aus *Bacillus spec.*, von großer Bedeutung. Auf Grund der hohen Aktivität bei höheren Temperaturen und alkalischen pH-Werten sind diese Enzyme besonders für Applikationen in Waschmitteln prädestiniert und wurden in einer solchen Anwendung erstmals 1963 verwendet [104]. Unter den industriell

relevanten Biokatalysatoren stellen Peptidasen und dabei insbesondere Subtilisin die mengenmäßig größte Gruppe dar. Etwa 900 Tonnen reines Enzym wurden im Jahr 2002 in Europa produziert [106]. Zum Einsatz kommen die Peptidasen hauptsächlich in Wasch- und Spülmitteln, um proteinbasierte Verunreinigungen abzubauen. Generell ist Subtilisin eines der meist erforschten Enzyme und wurde in fast allen seiner Eigenschaften für die industrielle Applikation optimiert [82]. Dabei wurden bereits über 50 % aller Aminosäuren modifiziert, wodurch die katalytische Aktivität beeinflusst und neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel wichtiger Aminosäuren im aktiven Zentrum des Proteins gewonnen wurden [69, 82, 107, 108].

2. Zielsetzung

Die stetig steigende Nachfrage nach neuen, verbesserten Biokatalysatoren treibt die Suche nach unerforschten Enzymquellen an. Basidiomyceten, mit etwa 30.000 zugehörigen Spezies, stellen noch eine weniger erforschte Organismengruppe dar. In Vorarbeiten wurden Enzyme für relevante bzw. potenzielle industrielle Anwendungen identifiziert und charakterisiert. Dabei wurde das Augenmerk zum einen auf die Aromastoffproduktion (Lipoxygenase) und zum anderen auf die Anwendung in Detergenzien (Peptidase) gelegt.

Basierend auf den Vorarbeiten und der heterologen Expression der jeweiligen Gene, sollten weitere, nah verwandte Enzyme gefunden bzw. Gensequenzen amplifiziert und auf ihre Eignung in der jeweiligen Anwendung getestet werden.

1. Zur bekannten Lipoxygenase 1 aus *Pleurotus sapidus* [97, 109, 110] sollten orthologe Gene aus Vertretern des Genus *Pleurotus* amplifiziert, exprimiert und die korrespondierenden Enzyme anschließend miteinander verglichen werden.
2. Nach der erfolgreichen Expression des Peptidase-Gens *pop1* aus *Pleurotus ostreatus* [111] sowie der Rückfaltung des Enzyms sollte das Homolog dieses Enzyms aus *Pleurotus pulmonarius* charakterisiert werden. Der Stamm wurde in einem Screening als vielversprechender Kandidat für eine Waschmittelanwendung identifiziert. Zusätzlich sollte das Expressionssystem in Hinblick auf eine potenzielle industrielle Applikation angepasst werden, um den Aufwand zur Gewinnung aktiven Enzyms zu minimieren.

3. Vorwort: "Orthologous Lipoxygenases of *Pleurotus* spp. - A Comparison of Substrate Specificity and Sequence Homology"

Auf der Suche nach potenten Enzymquellen wurden in verschiedenen Vorarbeiten Basidiomyceten, speziell *Pleurotus sapidus* aus der Gattung der Seitlinge, als vielversprechende Organismen für die Nootkaton-Biosynthese identifiziert. Besonders die Ganzzell-Biotransformationen mit gefriergetrocknetem Pilzmyzel waren dabei erfolgreich und erzielte Ausbeuten von ca. 300 mg/L (+)-Nootkaton [98]. Nach Etablierung verschiedener chromatografischer Schritte sowie eines Testsystems, welches gefriergetrocknetes, inaktiviertes Pilzlyophilisat beinhaltete, konnte das verantwortliche native Enzym Lipoxygenase 1 aus *Pleurotus sapidus* (LOX1Psa) isoliert und charakterisiert werden [97, 98, 112]. Die Identifikation des Enzyms ermöglichte molekularbiologische Ansätze, wodurch das codierende Gen von cDNA amplifiziert werden konnte. Die heterologe Expression wurde erfolgreich in *Escherichia coli* umgesetzt [109]. Das aktive rekombinante Enzym war aktiv gegenüber Linolsäure und setzte im Testansatz nur unter Zugabe von inaktiviertem Lyophilisat (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton um.

Weiterführende Screenings zeigten, dass auch nah verwandte Vertreter der Gattung *Pleurotus*, z. B. der Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*), Potenzial für Anwendungen in der Valencen-Biotransformation besaßen. Die nahe Verwandtschaft der verwendeten Stämme zeigte sich bereits bei der Identifizierung dieser mittels ITS-Sequenzierung. Die sonst hochvariablen 18S-rDNA Bereiche waren zu 99 % identisch. Die Vermutung war, dass auf Proteinebene nur geringfügige Abweichungen der Aminosäuren bestehen, welche die Enzymaktivität und -effektivität in der Biotransformation von (+)-Valencen positiv beeinflussen können.

Erneut sollte heterologe Expression in *E. coli* verwendet werden, um größere Mengen Enzym zu produzieren und anschließend die Eigenschaften fünf verschiedener Enzyme in Biotransformationen vergleichen zu können. Zusätzlich sollte eine Deletionsmutante des Enzyms erzeugt werden, in der die N-terminale β -barrel-Struktur entfernt wurde. Diese Domäne kann einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben und durch die potenzielle Funktion als Membrananker die Lokalisation des Proteins beeinflussen. Den Ergebnissen von Zhang *et al.* folgend [85], wurde die codierende Sequenz der Domäne deletiert, um eine Erhöhung der Lipoxygenase-Aktivität zu erreichen.

Terpene und Terpenoide sind eine große Stoffklasse ubiquitär verbreiteter Kohlenwasserstoffe. Sie sind hauptsächlich in Ölen verschiedener Citrusfrüchte und

Nadelhölzer aufzufinden. Besonders Monoterpene dienen in ihrer natürlichen Funktion als Insektizide [113]. Diese Bioaktivität hat einen großen Anteil daran, dass diese Stoffklasse von solch großem wirtschaftlichem Interesse ist. Phytochemikalien im Allgemeinen, zu denen auch Terpene und Terpenoide gehören, umfassen einen jährlichen Umsatz von über zwölf Milliarden US-Dollar.

Vornehmlich sind Terpene als Aromastoffe in verschiedenen industriellen Anwendungen zu finden, ob als geruchsaktive Stoffe in Reinigungsmitteln oder zur Aromatisierung in Getränken. Auch der Markt für Aromastoffe befindet sich stets im Wachstum und erwirtschaftete im Jahr 2013 insgesamt etwa 24 Milliarden US-\$ [114]. Um die Bereitstellung der Produkte bei steigenden Nachfragen sichern zu können, werden stetig neue Produktionswege erforscht bzw. bereits bestehende Verfahren optimiert. Im Fokus stehen dabei seit Längerem Verfahren, deren Produkte im Sinne der europäischen Regularien als „natürliche Aromen“ gekennzeichnet werden dürfen.

Die Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 Artikel 3/Begriffsbestimmungen 2c) nimmt dabei Bezug auf die Herkunft von Aroma-Vorstufen und Prozessen, die natürlichen Ursprungs sein müssen: „[...] ,natürlicher Aromastoff‘: Aromastoff, durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen, die als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden [...]“.

Prozesse, die Enzyme mikrobiellen Ursprungs beinhalten, werden ebenfalls von dieser Regelung umfasst, also sowohl Biotransformationen mit Ganzzellsystemen, als auch mit heterolog produzierten, isolierten Enzymen.

4. “Orthologous Lipoxygenases of *Pleurotus* spp. - A Comparison of Substrate Specificity and Sequence Homology”

4.1 Abstract

A selection of *Pleurotus* spp. was screened for intracellular lipoxygenase activity, and strains with distinguished activities were chosen for a screening on the molecular level. Lipoxygenase genes from five different *Pleurotus* spp. were amplified from the corresponding cDNA, functionally expressed using a cold shock expression system in *E. coli* BL21DE3 Star cells and characterized for specific activity and reaction optima. All lipoxygenase sequences coded for proteins of 643 amino acids, sharing similarities > 95 % among each other and to a previously characterized LOX_{Psa1} from *Pleurotus sapidus*. Lipoxygenase activities were quantified using linoleic acid as substrate and reached similar values ranging from 95 U/mg to 118 U/mg, with K_m values between 58 and 106 μ M. Optimum reaction conditions were pH 7 and 30 to 35 °C. However, the uncommon trait of accepting (+)-valencene, a sesquiterpene hydrocarbon substrate, differed strongly between two clusters of highly homologous sequences. No exchange of amino acids adjacent to the active site was found. Cloning and expression of a truncated LOX_{Psa1} sequence missing 144 amino acid residues of the N-terminal barrel domain yielded soluble protein but no measurable activity.

4.2 Keywords

Pleurotus; Basidiomycete; Lipoxygenase; Heterologous Expression; (+)-Valencene

4.3 Highlights

- Lipoxygenase genes were amplified from five *Pleurotus* spp.
- Sequences showed similarities > 95 % on the amino acid level.
- Reaction optima of the heterologous enzymes were pH 7 and 30 to 35 °C.
- Activities with linoleic acid as substrate ranged from 95 U/mg to 118 U/mg.
- Valencene dioxygenation differed strongly from 101.5 to 357.5 μ g product/mg enzyme.

4.4 Introduction

Basidiomycetes represent a group of organisms with increasing relevance in current research as well as in industrial processes. Application of enzymes were described for the decolorization of industry waste water [115], or the synthesis of secondary metabolites, such as pharmaceuticals [116] or flavor compounds [97]. Well known especially for their lignin degrading enzyme repertoire (laccases, peroxidases) [115], basidiomycetes are the source of a multitude of other enzymes, such as esterases [117], lipases [118], and peptidases [119]. The enzymatic generation of flavor components appears particularly promising, since these substances can be labeled “natural”, according to applicable regulations [97].

Subject of this study were lipoxygenases, a non-heme iron containing class of enzymes, capable of regio- and stereospecifically inserting molecular oxygen in (*cis*)-polyunsaturated fatty acids [94]. Lipoxygenases were found throughout plants, animals and fungi. This group of enzymes is especially known for the synthesis of compounds involved in cell signaling [95], but was also considered to catalyze the formation of C₈ volatiles (3-octanol, 3-octanone, 2-octen-1-ol, 1-octen-3-ol), which contribute to the typical mushroom aroma [120].

Another highly sought-after compound is (+)-nootkatone [113], imparting a grapefruit-like aroma, which is obtained by converting (+)-valencene (Figure 4-1) from orange peel using a lipoxygenase from *P. sapidus* [112]. The gene coding for this lipoxygenase was cloned, and expression in *E. coli* yielded a potent functional enzyme [109]. Based on the hypothesis that other closely related members of the genus *Pleurotus* may possibly harbor enzymes capable of catalyzing the reaction with even higher activities, a screening with a selection of *Pleurotus* strains was initiated. To determine differences in the enzymatic properties, a molecular approach was chosen to eliminate possible effects of cultivation conditions on gene expression. Soluble recombinant enzymes were obtained by cold-shock expression in *E. coli* BL21DE3 Star cells and investigated in detail.

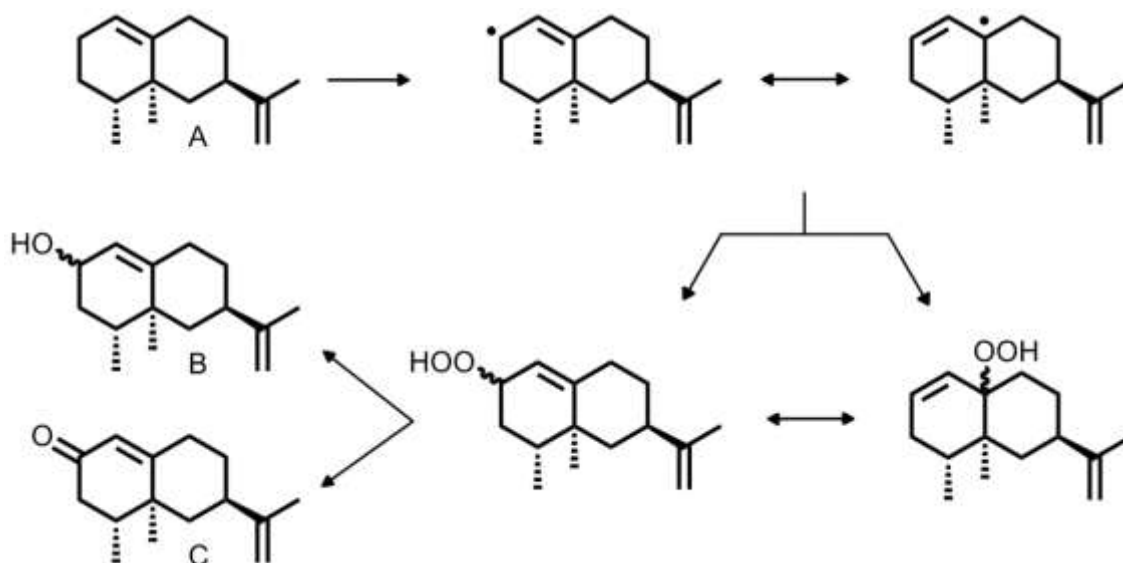


Figure 4-1

Conversion of (+)-valencene (A) via hydroperoxides resulting in nootkatols (B) and the grapefruit flavor impact (+)-nootkatone (C).

4.5 Materials and Methods

4.5.1 Chemicals

All chemicals used were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Sigma (Neu-Ulm, Germany), and Merck (Darmstadt, Germany). PCR primers were ordered from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

4.5.2 Strains, culturing conditions and activity screening

The *Pleurotus* strains were obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany) and CBS (Utrecht, Netherlands): *Pleurotus sapidus* (DSMZ 8266; internal nomenclature - Psa69), *P. ostreatus* (DSMZ 8266; Pos219), *P. sapidus* (CBS 195.92; Psa224), *P. dryinus* (DSMZ 5178; Pdr252), *P. sajor-caju* (synonymous with *Lentinus sajor-caju*) (DSMZ 5339; Psaj284). The identity of strains was confirmed by ITS-sequencing using the primers ITS1_fw (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') and ITS4_rev (5'-CTC CGC TTA TTG ATA TGC T-3').

Fungal stock cultures were grown on agar plates containing standard nutrient solution (SNL) + 15 g/L agar agar. Submerged cultures of the strains were grown in SNL at 150 rpm and 24 °C (30 g/L glucose monohydrate, 3 g/L yeast extract, 4.5 g/L asparagine monohydrate, 0.5 g/L MgSO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 1 mL trace element solution, pH 6.0 [0.08 g/L FeCl₃, 0.09 g/L ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.005 g/L CuSO₄ · 5 H₂O, 0.027 g/L MnSO₄, 0.4 g/L Titriplex III]). 50 mL SNL pre-cultures were inoculated with a densely grown piece

from the agar plate (1 cm²). After 7 days, 250 mL main cultures were inoculated with 20 mL of pre-cultures. Samples were taken from the main cultures on different days of cultivation. Mycelium was harvested by centrifugation. Cell pellets and culture supernatants were stored at -20 °C for further use.

To determine lipoxygenase activities, 500 mg of wet biomass were lysed with a Precellys homogenizer (PeqLab, Erlangen, Germany). Crude extracts were used for valencene biotransformation, whereas cleared supernatants of crude extracts after centrifugation at 5,000 x g for 10 min were subjected to linoleic acid assays.

4.5.3 Linoleic acid assay

Enzymatic activities were determined by a photometric assay described by Gökmen *et al.* [121], following the previously established protocol by Plagemann *et al.* [110, 112]. All shown values are means of two separate triplicate measurements. Firstly, the temperature optimum was determined in 50 mM sodium phosphate (pH 7.5). Prior to enzyme addition, all solutions were pre-incubated at the respective temperatures.

Secondly, the pH optimum was investigated using Britton-Robinson buffer (40 mM H₃BO₃; 40 mM H₃PO₄; 40 mM CH₃COOH; 20mM NaOH to adjust pH) [122] ranging from pH 4.0 to 9.5. Further enzymatic assays were performed applying optimum conditions. Possible background activity was eliminated by including a sample from empty vector expression in each series of measurements. Average K_m values were calculated from four separate duplicate measurements at optimal reaction conditions using Lineweaver-Burk-plots. Final concentrations of linoleic acid from 18 to 364 μ M were used.

4.5.4 (+)-valencene biotransformation

Biotransformation of (+)-valencene and extraction of (+)-nootkatone were carried out following Zelena *et al.* [109]. The entire lysate of 500 mg of biomass or 0.5 mg of purified recombinant enzyme in a total volume of 2 mL 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5 was incubated with 1 μ L (+)-valencene (Döhler, Darmstadt, Germany) for 16 h at room temperature and continuous shaking at 220 rpm. 25 mg lyophilized, heat inactivated (95 °C, 1 h) mycelium of *P. sapidus* (DSMZ 8266) was added to the recombinant enzyme. Bioconversion products were extracted with 1 mL *n*-hexane and characterized by Huber staining [123] and gas chromatography. During the initial screening, Huber assay and GC were used for qualitative evaluation of (+)-valencene conversion. Bioconversion

experiments with recombinant enzymes were also evaluated quantitatively by including an internal cyclohexanol standard.

4.5.5 Nucleic acid extraction

200 mg mycelium was used for each preparation. Mycelium from agar plates was disintegrated in LETS buffer (0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, pH 8, 10 mM TRIS/HCl pH 8, 0.5 % w/v SDS) using glass beads and a Precellys homogenizer (Peqlab). Subsequently, gDNA was isolated using phenol/trichloromethane/isopentylalcohol (25:24:1) extraction [124].

Total RNA was obtained from mycelium, previously harvested from submerged cultures, following the protocol of the innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Germany). Nucleic acid samples were stored at -70 °C upon further use.

4.5.6 cDNA synthesis

cDNA synthesis was carried out using SMARTScribe Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA) and additional RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Roth, Germany) according to the manual. 2 to 3 µg of total RNA were used for first strand synthesis with oligo-dT primers and the following program: 42 °C 60 min, 50 °C 10 min and 70 °C 5 min.

4.5.7 Primer design, PCR and cloning

Primers were derived from the known gene sequences of a valencene dioxygenase gene from *P. sapidus* [109] as well as a lipoxygenase gene from the sequenced genome of *P. ostreatus* (JGI Genome Portal [93, 125]). All PCRs were performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas) and the Master Cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplifications were carried out using the primer set lox1_fw 5'-CGT CGG CAC AAG TAC AAT GG-3' und lox1_rev 5'-TCA AAT TAC AAT CGC ATT TGC G-3' and the following PCR conditions: 95 °C 2 min; 36 cycles – 95 °C 15 sec; 50 °C 30 sec; 72 °C 30 - 45 sec/kb – 72 °C 5 min; storage at 4 °C. Amplifications were monitored with 1.5 % agarose gel. Fragments of the expected size were eluted using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and subsequently ligated to *EcoRV* linearized pUC57 vector using T4 DNA ligase (Thermo Scientific). The plasmid DNA was propagated in *E. coli* TOP10 cells and isolated with the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel). Verified sequences

(extended hot-shot sequencing; Seqlab, Göttingen, Germany) were re-amplified from the pUC57 constructs with universal primers containing unique restriction sites for directed ligation into the expression vector pCOLD DNA I (TaKaRa, Göttingen, Germany). Primer sequences were as follows (restriction sites underlined): lox1_fw_NdeI (5'-CGT CGG CAC AAG TAC ATA TGG-3'); lox1_fw_NdeI_truncated (5'-GAG AGG CAT ATG GAC CAG GGA TG-3'); lox1_rev_HindIII (5'- GAC GAT AAG CTT CAA ATT ACA ATC GCA TTT GCG-3'). PCR products and pCOLD DNA I were double digested with *NdeI* and *HindIII* (Fast Digest, Fermentas) and after elution from 1.5 % agarose gels subsequently ligated using a molar ration of 2:1 (insert:plasmid). The ligations resulted in the following expression constructs: Lox1 69; Lox1 69 short (truncated by 144 N-terminal amino acids); Lox1 219; Lox1 224; Lox1 252; Lox1 284.

4.5.8 Sequence analysis

Obtained sequences were evaluated and aligned using GENTle [126] and Clustal Omega [127]. They were subsequently submitted to the European Nucleotide Archive (Cambridge, UK). The respective accession numbers can be found in Table 4-1.

4.5.9 Gene expression and protein purification

Chemo-competent [128] *E. coli* DE3 Star cells (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), containing the chaperone-encoding plasmid pTf16 (TaKaRa), were transformed with the expression constructs. A BL21DE3 Star strain containing pTf16 and empty pCOLD DNA I plasmids served as a negative control. Expression strains were selected on LB agar with 50 µg/mL ampicillin and 20 µg/mL chloramphenicol. Overnight cultures were grown to inoculate 125 mL MDAG-135 minimal medium [129] in 500 mL baffled shake flasks to an OD₆₀₀ of 0.1. Chaperon expression was induced with 0.5 mg/mL L-arabinose, and cells were grown at 37 °C and 200 rpm. Cultures were subjected to cold shock for 30 min at 4 °C when an OD₆₀₀ of 0.6 was reached. Afterwards gene expression was induced using 100 µM IPTG and the cultivation was carried on at 12 °C and 200 rpm for another 16 h. Cultures were harvested and pellets were resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 and lyzed using glass beads and a Precellys homogenizer. Cleared supernatant was further used for immobilized metal affinity chromatography using a batch method with Ni-NTA agarose (Qiagen, Hilden, Germany). Purification was performed according to standard protocols (The Qiaexpressionist, Qiagen). The target protein was eluted with 3 mL 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 + 250 mM imidazole. Lastly, the elution

fractions were re-buffered to 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 with PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Aliquots of the enzyme solution were stored at -20 °C. Purification and expression were monitored using SDS-PAGE according to Laemmli [130] with 12 % (w/v) polyacrylamide gels. Protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.* [131] using the DC™ Protein-Assay (Bio-Rad) with bovine serum albumin (0.2 – 1.0 mg/mL) calibration standards.

4.5.10 Gas chromatography/flame ionisation detection (GC/FID)

For each sample, 1 µL of the bioconversion extract was injected into a Perkin Elmer Auto System XL gas chromatograph (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) with a 30 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 µm Optima Wax column (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The system was equipped with an autosampler and a split/splitless injector, operating in the splitless mode (275 °C). Volatiles were detected using a flame ionisation detector (250 °C). The oven temperature was held at 70 °C for 1 min, raised at 10 °C/min to 230 °C and held for 10 min. Hydrogen was used as carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. Identification of transformation products was performed by comparing the linear retention indices (RI) with data of former studies [109].

4.6 Results/Discussion

4.6.1 Screening

A random selection of strains belonging to the genus *Pleurotus* (DSMZ offers 32 different strains) was screened to compare enzymes of different origins to the known valencene converting lipoxygenase LOX_{Psa1} from *Pleurotus sapidus* [97, 109, 112].

Selection of strains for molecular characterization was based on positive responses in the biotransformation of linoleic acid and valencene using cell lysates (Table 4-1). Detailed characteristics of the LOX from *P. sapidus* were described previously by Krügener *et al.* [98]. Thus, this strain and the respective enzyme served as positive control throughout the experiments. Strains Pos219 and Psaj284 were chosen due to their overall good activities, utilizing (+)-valencene and linoleic acid comparable to Psa69. Pdr252 displayed a significant response to the Huber staining solution after (+)-valencene biotransformation, but no substrate conversion was observed using the GC/FID, indicating the formation of hydroperoxides without a measurable formation of (+)-nootkatone. Psa224, supposedly closely related to Psa69, was chosen due to its negative screening results. Two hypotheses

were examined: 1) mutations in the genetic sequence causing the different activities [132, 133], or 2) altered expression levels of the genes coding for the respective activity [134].

Table 4-1

Screening results of the *Pleurotus* spp. strains: qualitative conversion of (+)-valencene and linoleic acid. The assays were performed with freshly lyzed wet biomass. *P. sapidus* (Psa69) lyophilisate served as a reference [109] and as negative control after inactivation (60 min at 95 °C). ++ - reference/enzymatic activity comparable to reference; + - enzymatic activity, less than reference; o – no detectable enzymatic activity. Specific lipxygenase activities as well as K_m values were calculated from linoleic acid assay results. Additionally, the highest obtained (+)-nootkatone yield per mg after (+)-valencene biotransformation as well as the accession number for the respective recombinant enzyme are given.

Internal strain number	accession number of respective Lox1 gene sequence	cell lysates			purified recombinant enzymes		
		(+) -valencene conversion	lipxygenase activity		specific lipxygenase activity [U/mg]	K_m [μM]	maximum (+)-valencene biotransformation [μg (+)-nootkatone/mg enzyme]
		Huber stain	GC analysis				
<i>Psa69</i>	ENA HF913621.1	++	++	++	111.0	105.9	357.5
<i>Pos219</i>	ENA HF913618.1	++	+	++	99.7	58.0	254.7
<i>Psa224</i>	ENA HF913620.1	o	o	o	102.0	84.4	101.5
<i>Pdr252</i>	ENA HF913617.1	++	o	+	118.0	70.8	119.8
<i>Psa284</i>	ENA HF913619.1	+	+	+	95.4	72.6	336.1

4.6.2 Analysis of nucleotide and derived amino acid sequence of the lipxygenase genes

The amplification of lipxygenase genes, 1932 bp each, from all cDNA templates used was accomplished successfully including the full gene sequence coding for Lox1 Psa69 [109] (Figure 4-2). [97] described a partial sequence. This gene served as a control to exclude potential contaminations with the other closely related templates. All amplified sequences coded for proteins of 643 amino acids sharing sequence similarities > 95 % (Figure 4-3). These extensive similarities were expected, as ITS sequences showed similarities of 99 % within the tested strains emphasizing the close relationship among members of *Pleurotus* spp. Similarly, Punelli *et al.* [135] have described high sequence homologies for laccases found in *Pleurotus spec.*

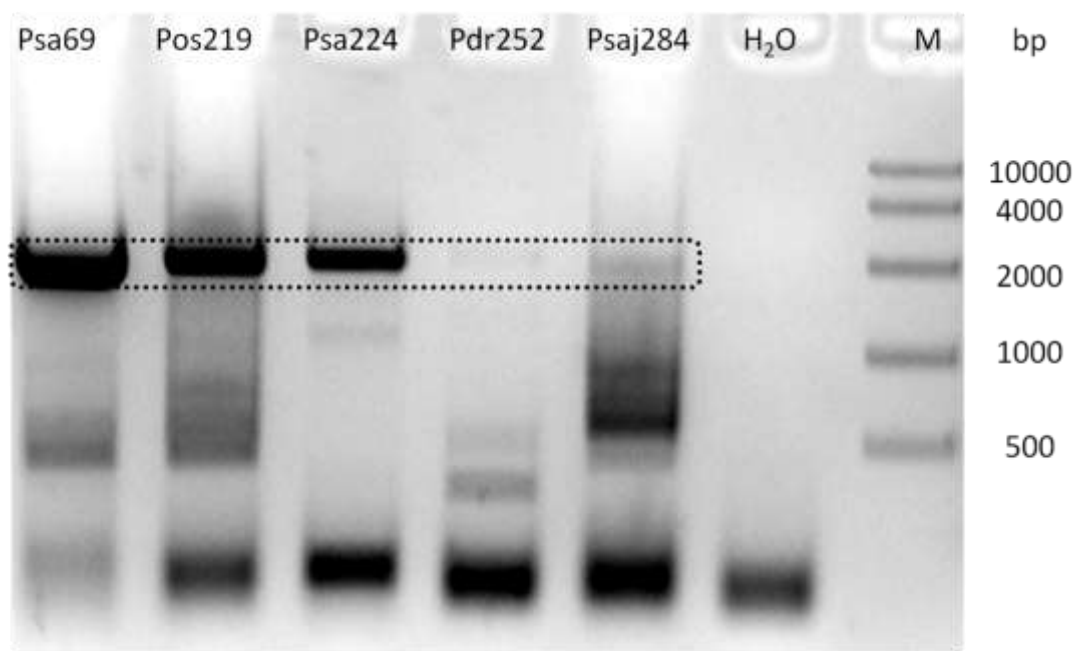


Figure 4-2

Agarose gel (1.5 %) after amplification of Lox1 genes from cDNA of different *Pleurotus* spp. The target bands with an expected size of 1932 bp appear framed. M: FastRuler High Range DNA Ladder (Fermentas).

There were two clusters of amino acid sequences sharing similarities > 99 %, with Lox1 Psa69 / Lox1 Pos219 / Lox1 Psaj284 belonging to the first group, and the second group comprising Lox1 Psa224 / Lox1 Pdr252. Sequences derived from the two putative *P. sapidus* strains displayed the least sequence identities on amino acid level (ca. 95 %), indicating inconsistencies with the correct identification of *Pleurotus* subspecies. A recently published lipxygenase from *P. ostreatus* (GenBank BAL46153.1) [136]

showed similarities of around 79 %, indicating the presence of another lipoxygenase gene in a *Pleurotus* spp.

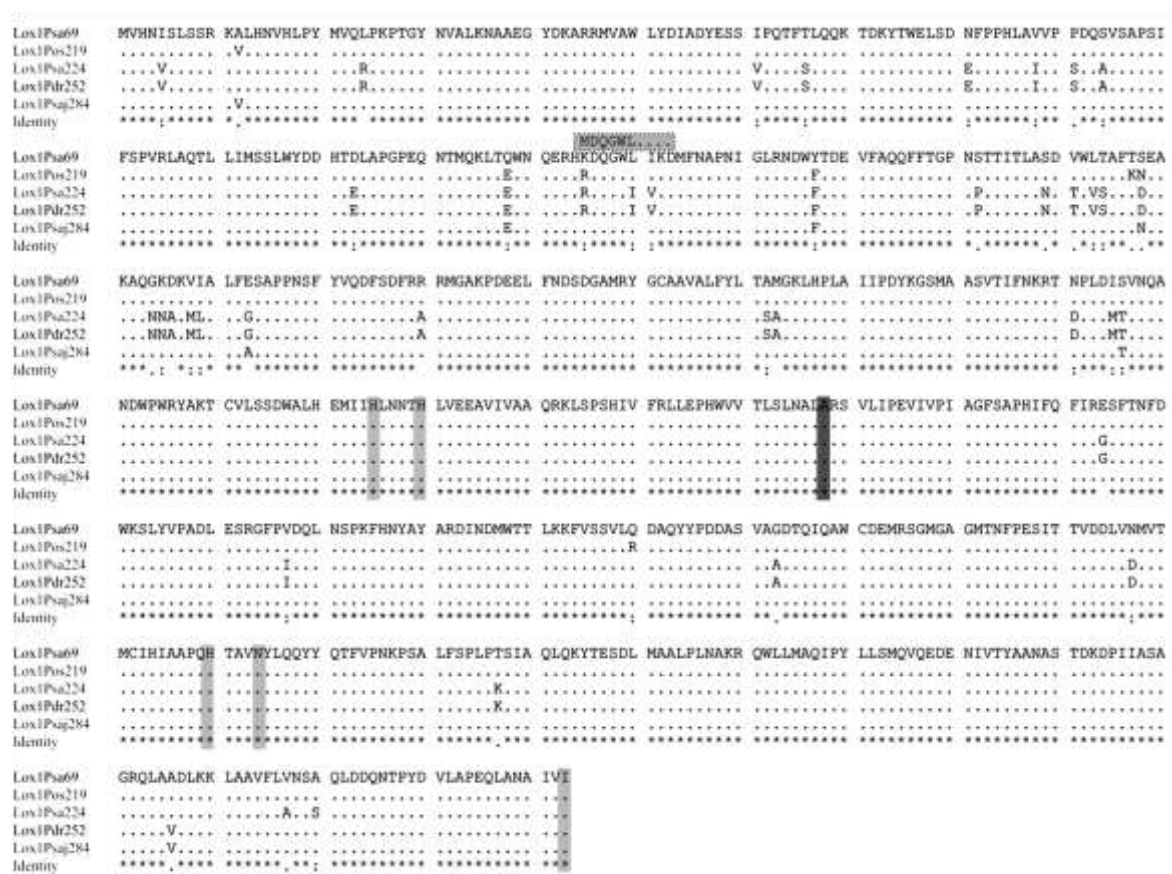


Figure 4-3

Alignment of the amino acid sequences deduced from the respective cDNA fragments. Residues responsible for iron coordination are highlighted in light gray, the residue determining the stereo specificity [137] is highlighted in dark gray. The starting sequence of the truncated Lox1 69 is shown in the dotted gray box. The sequence coding for the 144 N-terminal amino acids was eliminated in this construct.

All amino acid residues relevant for iron coordination (residues 325/330/510/514/643) and stereochemical properties (residue 368), as described by Coffa and Brash [137], were conserved, as were their surrounding amino acid residues (Figure 4-3). Variation of amino acids cumulated towards the N-terminal region, particularly from position 182 to 213, but occurred throughout the sequences. Many of the exchanges were homologous, but a few were not, indicating possible hot spots. Among these were, for example, the exchange of leucine in position 24 of Lox1Psa69, Pos219 and Psaj284 to arginine in Lox1Psa224 and Lox1Pdr252, and likewise the exchange of proline to serine in position 91 and *vice versa* in position 182, and, towards the C-terminus, the exchange of glutamic acid to glycine in position 394 and of threonine to lysine in position 536 (Figure 4-3).

4.6.3 Cloning of a truncated lipoxygenase gene

The 3D-structure of the Lox1 Psa69 was modeled using the soybean Lox1 and the rabbit reticulocyte 15S-lipoxygenase as templates (www.pdb.org; data not shown). Low similarities (Z-scores < -4) were found impeding reliable structural predictions. The models, however, suggested an N-terminal accumulation of β -sheets. This domain was supposed to act as a membrane anchor preventing the formation of higher yields of soluble functional protein. Thus, a truncated Lox1 Psa69 was generated by eliminating the coding sequence of the 144 N-terminal amino acids (Figure 4-3/Figure 4-4). Against expectations, the truncated LOX showed measurable activity for neither linoleic acid nor (+)-valencene. This indicated that the amino acids located towards the N-terminus were essential for proper folding or stabilization of the protein. The effect established for truncated Lox1 Psa69 did not correspond with results by Zhang *et al.* [85] for an *Anabaena* lipoxygenase, which was produced in active form in *E. coli* using a shortened sequence. Literature provides ambiguous information on the influence of the N-terminal domain of lipoxygenases. On the one hand, for soybean lipoxygenase 1 the C-terminal lipoxygenase domain remained active even when the N-terminal domain was cleaved off [138, 139]. On the other hand, the two domains are usually tightly associated [140], and an influence of the N-terminal domain on the enzymatic activity was suggested [138]. It was speculated that the added terminal His₆-tag interfered with the proper active conformation of the enzyme, thus inhibiting substrate turnover [141]. This appears unlikely in the present case, since the successful purification via Ni-NTA indicated that the tag was freely accessible on the outside of the protein. Future experiments, using expression constructs with and without tagging in another expression system, for example in *Pichia pastoris*, may result in a better understanding of the interplay of the C-terminal and the N-terminal domain.

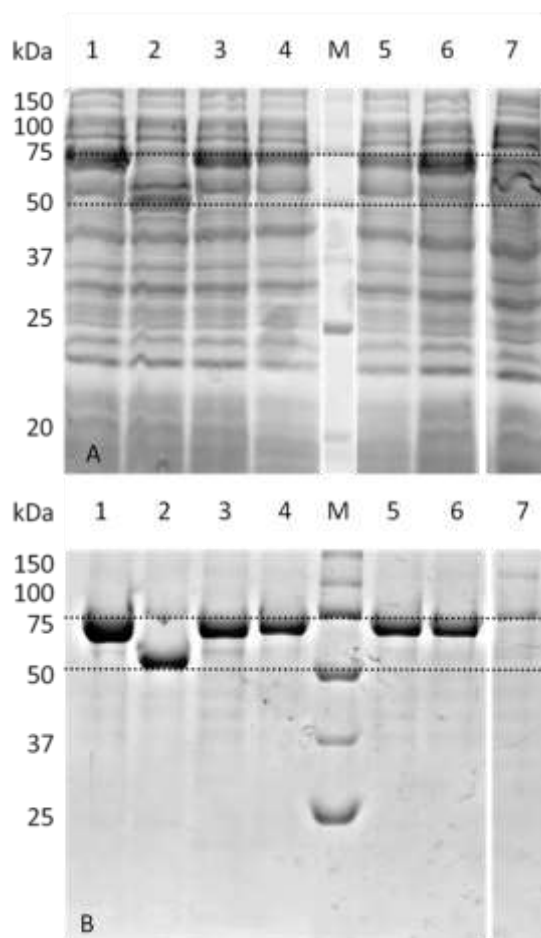


Figure 4-4

Coomassie stained SDS-PAGE gel (12 %) of the soluble intracellular fraction of the expression cultures (A) and the Ni-NTA purified and rebuffed recombinant proteins (B). The expected sizes of the proteins of interest were about 72 kDa for full length lipoxygenases and 56 kDa for the truncated Lox1 Psa69 (Lox1 Psa69 short). M: Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad). 1) Lox1 Psa69 2) truncated Lox1 Psa69 3) Lox1 Pos219 4) Lox1 Psa224 5) Lox1 Pdr252 6) Lox1 Psaj284 7) empty pCOLD

4.6.4 Recombinant protein production and purification

The hexa-histidine tag was incorporated at the N-terminus to avoid any interference with the catalytic process, because the C-terminus in these lipoxygenases participates in iron binding. All full length lipoxygenases and the truncated Lox1 Psa69 obtained in soluble form were used for this study (Figure 4-4 A). The purification yielded between 0.5 mg/mL and 1 mg/mL of virtually electrophoretically pure protein in the elution fractions (Figure 4-4 B). All steps of protein purification were also performed with expression cultures containing an empty vector (pCOLD DNA I) to exclude possible effects of *E. coli* protein contamination.

4.6.5 Biochemical characterization of lipoxygenase properties

To investigate possible influences of the amino acid exchanges on catalytic properties of the recombinant lipoxygenases, the optimal reaction conditions were determined using linoleic acid as substrate. The full length lipoxygenases all exhibited optimal substrate conversion at 30 to 35 °C (Figure 4-5). The enzymes exhibited best activities between pH 6 and 7, with 100 % of relative activity at pH 7 in all cases (Figure 4-6). The relative activity decreased rapidly with increasing pH. Overall, the reaction conditions varied slightly from optimal growth conditions, for example, as determined for *P. ostreatus* by Adebayo-Tayo *et al.* [142], being 25 °C and a pH of 8 for this particular strain. Application of optimized reaction conditions yielded the maximum specific activity of the recombinant enzymes. The values obtained ranged from 95 Units/mg for Lox1 Psaj284 to 119 Units/mg for Lox1 Pdr252 (Table 4-1). K_m values of 58.0 μ M for Lox1 Pos219 and 105.9 μ M for Lox1 Psa69 were obtained with linoleic acid as the substrate. These data agreed with previous findings of Plagemann *et al.* [110] and Zelena *et al.* [109].

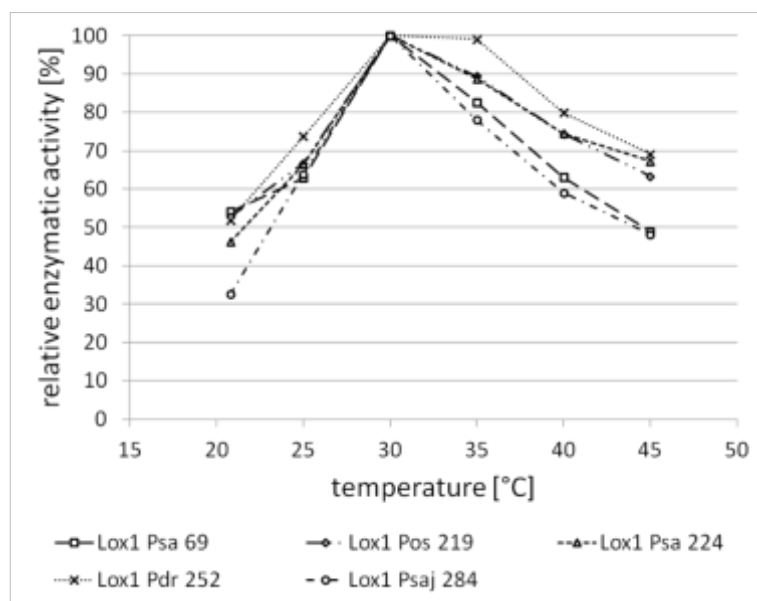


Figure 4-5

Influence of the incubation temperature on the activity of recombinant lipoxygenases. The activities were determined using a linoleic acid assay in 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.5. The results are given as relative values, with 100 % being the highest measured activity of each respective enzyme during this series of measurements.

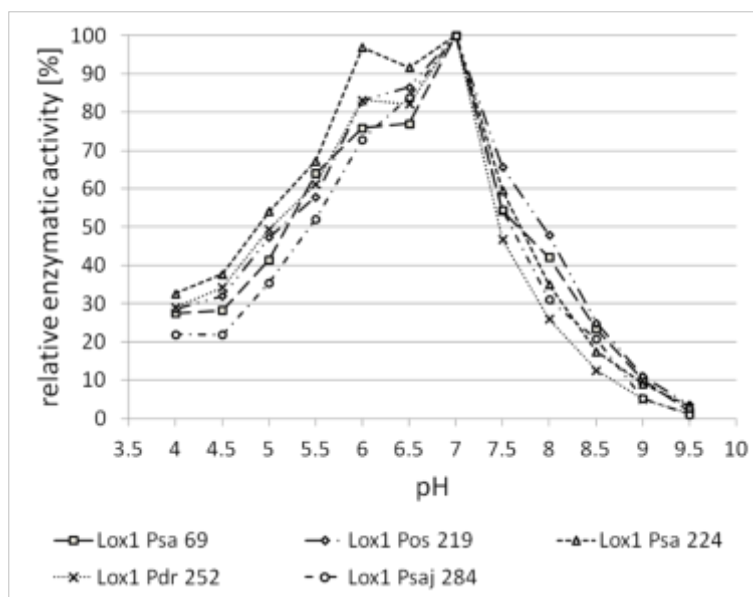


Figure 4-6

Influence of the pH value of the buffering system on the activity of recombinant lipoxygenases. The activities were determined using a linoleic acid assay in Britton-Robinson buffers with pH values from 4.0 to 9.5. The results are given as relative values, with 100 % being the highest measured activity of each respective enzyme during this series of measurements.

Altogether, with linoleic acid as the substrate, the lipoxygenases showed minor deviations of properties. The data suggested that differences in lipoxygenase activities during the initial screening of cell lysates (Table 4-1) were most likely due to different expression levels of the respective lipoxygenase gene, as the heterologously produced enzymes all possessed comparable specific lipoxygenase activities. A correlation of gene expression and resulting enzymatic activity was described, for example, for laccases by Collins and Dobson [134].

4.6.6 (+)-valencene biotransformation

The recombinant enzymes were characterized for their ability to convert (+)-valencene to the grapefruit flavor (+)-nootkatone. Despite almost identical activities using linoleic acid as the substrate, there were considerable differences in (+)-valencene turnover (Table 4-1). Lox1 Psa69 displayed the highest product yield in all measurements (100 % relative yield in duplicate measurements) with a maximum of 357 μ g (+)-nootkatone per mg recombinant enzyme. Distinctively lower yields were obtained for Lox1 Psa224 with 28 % relative yield, and 34 % relative yield for Lox1 Pdr252, respectively.

The differences correlated with the preceding screening results, as the two enzymes with less (+)-valencene conversion capacity, Lox1Psa224 and Lox1Pdr252, were derived from

strains showing no (+)-nootkatone synthesis, whereas lipxygenases from positively screened strains were able to produce considerably higher amounts of (+)-nootkatone. These findings were consistent with the two postulated sequence clusters (see Figure 4-3) indicating an influence of the amino acid sequence on this peculiar side activity. Reliable crystal structures from closely related organisms are required to predict the conformational influence of a certain amino acid exchange. However, it is common that minor changes may alter the substrate specificity of an enzyme drastically [143]. Furthermore, the possible presence of multiple sub-sites for substrate binding was described [144]. Protein modeling using appropriate templates would give a better idea, which amino acids influence the folding of *Pleurotus* spp. lipxygenases in a way to allow binding of the uncommon sesquiterpene substrate, while linoleic acid conversion remained unaltered.

4.7 Conclusion

Previously unknown genes from four strains of *Pleurotus* spp. coding for lipxygenases of 643 amino acids were amplified and compared to the previously elucidated Lox_{Psa1}. The obtained sequences shared similarities > 95 % on the amino acid level, while the ligands which determine iron coordination and stereochemistry were fully conserved. The heterologous lipxygenases showed similar pH and temperature optima and virtually identical specific activity toward linoleic acid. However, the side activity, valencene conversion, differed strongly.

The biocatalytic dioxygenation of non-fatty acid substrates to terpenoids and presumably other oxofunctionalized hydrocarbons is of general interest for the flavor and pharmaceutical industries, because oxygen is the only co-substrate required. Variants of the novel fungal lipxygenases may now be produced using the cold shock expression system established. However, a broader spectrum of sequences will be required for a concerted rational exchange of the crucial amino acids. Random mutagenesis would provide another option.

4.8 Acknowledgement

Support of the work by the BMBF cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) is gratefully acknowledged.

5. Vorwort: "Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*"

Auf der Suche nach potenten Waschmittelzusätzen wurden in Vorarbeiten verschiedene Basidiomyceten gescreent, um Peptidasen, auch für den Einsatz in Detergenzien, zu identifizieren. Wie bei Eisele *et al.* [111] beschrieben, wurde in *Pleurotus ostreatus* eine Peptidase (POP1), welche den Subtilasen zugehörig ist, kloniert, heterolog produziert und anschließend charakterisiert. Das etablierte Expressionssystem aus *E. coli* und dem Kälteschock-Expressionsvektor pCOLD DNA I resultierte dabei in der Produktion großer Mengen fehlgefaltetem und inaktivem Enzym. In der Folge mussten die *inclusion bodies* gereinigt und das Enzym in seine aktive, lösliche Konformation rückgefaltet werden.

Pleurotus spec. wurde als eine potente Quelle peptidolytischer Enzyme erkannt, weshalb ein weiteres Screening nahe verwandter Spezies durchgeführt wurde. Dabei fand man im Überstand der Pilzkultur von *Pleurotus pulmonarius* eine weitere native Peptidase, welche zur chromatografischen Reinheit präpariert und anschließend charakterisiert wurde (durch Frau Dr. Diana Linke).

Um jedoch Waschversuche durchführen zu können, waren größere Mengen des Proteins nötig. Deshalb bestanden die nachfolgenden Arbeitsschritte darin, die codierende Sequenz von PPP1 zu identifizieren und das Gen anschließend in *Pichia pastoris* heterolog zu exprimieren. Dieser Expressionsorganismus sollte dabei die aufwändigen Schritte der Rückfaltung, wie im Falle von POP1, entbehrlich machen. Auf Grund der Fähigkeit des Expressionswirts zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen sollte das Zielprotein bereits löslich und im Idealfall extrazellulär vorliegen, um das *downstream processing* des Zielenzyms auf ein Minimum zu beschränken. Zusätzlich sollte die Charakterisierung des Enzyms über die für den Waschprozess relevanten, biochemischen Parameter erfolgen. Die praktischen Aspekte eines Einsatzes in Waschmitteln sollten in ersten Waschversuchen im Mikrotiter-Format untersucht werden.

6. “Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*”

6.1 Abstract

A novel stain solving subtilisin-like peptidase (PPP1) was identified from the culture supernatant of the agaricomycete *Pleurotus pulmonarius*. It was purified to homogeneity using a sequence of preparative isoelectric focusing, anion exchange and size exclusion chromatography. Peptides were identified by *ab initio* sequencing (nLC-ESI-QTOF-MS/MS), characterizing the enzyme as a member of the subtilase family (EC 3.4.21.X). An expression system was established featuring the pPIC9K vector, an alternative Kozak sequence, the codon optimized gene *ppp1* gene without the native signal sequence with C-terminal hexa-histidine tag, and *Pichia pastoris* GS115 as expression host. Intracellular active enzyme was obtained from cultivations in shake flasks and in a five liter bioreactor. With reaction optima of 40 °C and a pH > 8.5, considerable bleaching of pre-stained fabrics (blood, milk and India ink), and the possibility of larger-scale production, the heterologous enzyme is well suitable for detergent applications, especially at lower temperatures as part of a more energy- and cost-efficient washing process. Showing little sequence similarity to other subtilases, this unique peptidase is the first subtilisin-like peptidase from *Basidiomycota*, which has been functionally produced in *Pichia pastoris*.

6.2 Keywords

Basidiomycota; Detergents; Heterologous expression; Peptidase; *Pichia pastoris*

6.3 Introduction

Peptidases (EC 3.4; also referred to as proteinases or proteases) are ubiquitously present throughout living organisms, due to their importance in pivotal biological processes, including regulation of enzymatic activity, protein stability, hormone production and digestion [145-148]. Peptidases can make up about 2 % of the overall protein number in an organism. The large variety of different catalyzed reactions, as well as the amount of different molecules underline the versatility of this class of enzymes. Unsurprisingly, the potential of peptidases has been recognized in various industrial branches, *e. g.* for the treatment of back pain [149], for milk processing and production of dairy products as well as for the treatment of meat and fish [119, 150, 151]. Furthermore, peptidases are successfully used in detergents and in bioremediation processes [147].

A group of organisms with great peptidolytic potential are basidiomycetes. This phylum, consisting of more than 30,000 species, is usually recognized for its wood-degrading activities and the responsible oxidoreductases, such as laccases. However, basidiomycetes also possess a large variety of proteolytic enzymes with unique characteristics and features [147, 152], allowing them to thrive on wood, a natural substrate poor in nitrogen sources. To date, several peptidases from basidiomycetes have been investigated for a potential application in food and feed processing, for example milk clotting [119] or the hydrolysis of wheat gluten [153].

The presented work focused on the potential application of a basidiomycetous peptidase in the detergent industry, where this class of enzymes has been successfully established long ago [154, 155]. Especially peptidases from alkaliphilic *Bacillus spec.* are common detergent ingredients to eliminate stains caused by proteins and peptides, such as blood stains [154, 156-159].

Screenings of basidiomycetes resulted in a considerable peptidase activity in culture supernatants of the genus *Pleurotus*, especially in *P. ostreatus* [111] and its close relative, the edible *P. pulmonarius* (Indian Oyster). A unique protein was isolated from the culture supernatant of *P. pulmonarius*, purified to homogeneity, and characterized biochemically. There exist very few examples for the active production of peptidases in *P. pastoris*, either from ascomycetes [160, 161] or basidiomycetes [146, 151]. Aiming at industrial-scale application, the coding gene was amplified, sequence optimized, and an expression system using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* was established to allow for larger-scale production. The suitability of the heterologous protein PPP1 in detergent applications was confirmed (patent number DE 10 2013 226 729 A1 [162])

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Materials

Chemicals used were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Steinheim, Germany), and Merck (Darmstadt, Germany). PCR primers were ordered from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). The *P. pastoris* expression system (including vectors and strains) were obtained from Invitrogen (Karlsruhe, Germany).

6.4.2 Strains, culture media and culturing conditions

Escherichia coli strain TOP10 (Invitrogen) was used as host for vector propagation and cultured in Luria–Bertani broth (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 10 g l⁻¹ sodium chloride) supplemented with ampicillin (100 µg l⁻¹; Invitrogen). *P. pastoris* yeast strain GS115 (Invitrogen) was propagated on YPD medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 20 g l⁻¹ glucose). Stock cultures of *P. pulmonarius* (obtained from DSMZ, Braunschweig, Germany; strain DSMZ 5531) were grown on agar plates containing standard nutrient solution (SNL; 30 g l⁻¹ glucose monohydrate, 3 g l⁻¹ yeast extract, 4.5 g l⁻¹ asparagine monohydrate, 0.5 g l⁻¹ MgSO₄, 1.5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 ml trace element solution, pH 6.0 (0.08 g l⁻¹ FeCl₃, 0.09 g l⁻¹ ZnSO₄ · 7 H₂O, 0.005 g l⁻¹ CuSO₄ · 5 H₂O, 0.027 g l⁻¹ MnSO₄, 0.4 g l⁻¹ EDTA)) + 15 g l⁻¹ agar agar. All submerged cultures were cultivated in SNL at 24 °C and 150 rpm (25 mm circular amplitude; Multitron, Infors, Einsbach, Germany). For pre-cultures a shake flask containing 50 ml of SNL was inoculated with 1 cm² of a densely grown stock culture. After seven days, 20 ml of the pre-culture were used to inoculate a 250 ml main culture. Samples were taken each day of the cultivation and analyzed by the assays described in 2.9. Cultures were harvested on the day of the highest measured peptidolytic activity.

6.4.3 Purification and identification of PPP1

The purification was performed using cleared culture supernatant (centrifugation for 30 min at 5,000 x g; 4 °C) as starting material. The preparative isoelectric focusing (IEF) was performed with Rotofor Cell from Bio-Rad (Munich, Germany). 20 ml supernatant was mixed with 1.5 % Servalyt® (40 % (w/v) pH 3-10, Serva, Heidelberg, Germany) and separation was performed at a constant power of 12 W at 4 °C for 4.5 h. Twenty fractions were analyzed for their pH and activity.

Following a concentration step of the pooled active fractions with Centricon Plus-70 centrifugal filter units (MWCO 10,000; Merck-Millipore, Billerica, USA), a HiTrap SP Sepharose XL column (1 ml, GE Healthcare, Little Chalfort, UK) was used. 5 ml of supernatant were mixed 1:1 with running buffer (20 mM sodium acetate buffer pH 6). The separation was performed at 1 ml min⁻¹ with a stepwise ionic strength gradient (100 mM, 200 mM, 300 mM, 1 M NaCl). Again, the active fractions were pooled and subjected to another concentration step.

250 µl of sample were applied on a Superdex 75 column (GE Healthcare, 20 ml) and separated with 20 mM sodium acetate, pH 5 as running buffer at 0.5 ml min⁻¹. For

determination of the molecular mass, standard proteins were used to create a calibration curve. The success of each purification step was monitored using the peptidase assay described (see “Peptidase activity assays”). The identification of the protein was performed as described in “Gel electrophoresis and protein identification”.

6.4.4 Gene identification and amplification

The total RNA of *P. pulmonarius* was isolated from mycelium harvested at the day of highest peptidase activity using the NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany) from approximately 250 mg of fresh mycelium which was harvested after four days of cultivation. cDNA synthesis was carried out using SMARTScribe Reverse Transcriptase (Takara Clontech, Paris, France). 9 µl of total RNA (approximately 2 µg) were incubated with 1 µl of 10 pmol µl⁻¹ oligo-dT-primer for 10 min at 70 °C followed by incubation on ice for 5 min. Subsequently 10 µl of a reaction master mix were added, to obtain the final conditions needed for a 20 µl reaction: 1x reaction buffer, 1.0 mM dNTPs, 2.0 mM DTT, 100 U reverse transcriptase and 40 U RiboLock (Thermo Scientific, Waltham, USA). The entire reaction mixture was incubated at 42 °C for 60 min and 50 °C for 10 min. Termination was carried out by heating at 70 °C for 5 min.

The PCR to obtain the gene of interest contained the following components: 0.5 µl of cDNA template; 5 µl 5x reaction buffer; 0.5 µl dNTP mix (2.5 mM each); 0.5 µl of forward and reverse primer (10 pmol µl⁻¹); 0.5 µl MgCl₂ (25 mM); 0.3 µl Phusion DNA Polymerase (Thermo Scientific); *Aqua*_{bidest} ad 25 µl.

The reaction mixture was incubated at 98 °C for 1 min, followed by 36 cycles at 98 °C for 5 s; 55 °C for 15 s and 72 °C for 45 s, final elongation was carried out at 72 °C for 10 min.

The complete *ppp1* gene sequence was amplified using the specific primers 5'-UTR_fw AGCCTCTAACCAGCCCACTT-3' and UTR_rev 5'-CTATCTAGGCGATGCCGAAG-3', which were derived from a gene from *Pleurotus ostreatus* PC15 v2.0 (JGI Genome database; Protein ID 1088545). Primers were designed to bind in the untranslated region of the gene. The gene was chosen due to the matching sequence of the resulting protein to the peptide sequences identified by nLC-ESI-QTOF-MS/MS (see “Gel electrophoresis and protein identification”).

6.4.5 Construction of the peptidase expression vector

The amplified sequence of *ppp1* was cloned into *EcoRV* linearized pUC57 vector using T4 DNA ligase (Thermo Scientific). Plasmids containing an insert were verified using

extended hot-shot sequencing (Seqlab, Göttingen, Germany). The sequence optimized gene was ordered from GeneArt® Gene Synthesis (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany). Primers were designed to incorporate unique restriction sites (*EcoRI/NotI*), an additional Kozak sequence (underlined in primer) [163] and a C-terminal hexa-histidine tag while eliminating the native signal peptide (fw 5'-TTTTTGAATTCACCATGGCGGCTCCAGCTTTGAAAACTGTTGAG-3' and rev 5'-TTTTTGC GGCCGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGAGCGTGGTGAGCCAAAT-3'). The native signal peptide sequence was assessed using SignalP 4.1 [164].

Using these sites, the gene was ligated into the expression vector pPIC9K to yield the pPIC9K x *ppp1* expression plasmid. Electro-competent *P. pastoris* GS115 cells were transformed with *AvrII*-linearized pPIC9K x *ppp1* by electroporation (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad) according to Lin-Cereghino [165]. Additionally, an empty vector control (pPIC3.5K, no alpha-factor signal sequence) was transformed likewise.

His⁺ transformants were selected on histidine deficient MD plates (20 g l⁻¹ glucose, 20 g l⁻¹ agar, 13.4 g l⁻¹ YNB, 400 µg l⁻¹ biotin, 50 mg l⁻¹ each of L-glutamic acid, L-lysine, L-leucine and L-isoleucin). Subsequently, a second selection step was performed, screening for resistance of the clones towards geneticin (G418; 1-4 mg l⁻¹) on YPD-G418 agar plates. Positive transformants were identified using PCR using the 5'-AOX primer (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') and 3'-AOX primer (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3').

6.4.6 Culture conditions for gene expression

Small scale expressions in 96-well plates were performed in YPD and BMMY medium in order to identify clones with peptidase activities (modified after a protocol by Sygmund *et al.* (2012) [166]). Pre-cultures of PPP1 producer clones were grown in 500 ml baffled Erlenmeyer flasks with YPD medium at 28 °C at 220 rpm (25 mm circular amplitude, Infors Multitron) for 96 hours. The cells were harvested at 2,000 x g for 5 min and subsequently resuspended in BMMY medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 13.4 g l⁻¹ YNB, 400 µg l⁻¹ biotin, 50 mg l⁻¹ each of L-glutamic acid, L-lysine, L-leucine and L-isoleucin, 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.0, 20 ml l⁻¹ methanol). The main culture was inoculated to an OD₆₀₀ of 1, if not stated differently, and incubated at 16 °C to 28 °C at 220 rpm (25 mm circular amplitude, Infors Multitron) for 96 hours. Methanol was added every 24 hours to a final concentration of 2 %. Cells were harvested by

centrifugation at 5,000 x g and 4 °C for 30 min. The activities of the extracellular and intracellular enzyme fractions were analyzed separately (see “Peptidase activity assays”).

6.4.7 Bioreactor cultivation

Large-scale cultivations were performed in stirred tank reactor with a marine-type propeller (5 L; KG5000, Medorex AG, Nörten-Hardenberg, Germany). 500 mL pre-cultures were grown in YEPD medium for 72 hours at 28 °C. Upon centrifugation, the entire biomass was used for inoculation of the reactor, to achieve a starting OD₆₀₀ of four. The batch-cultivation was performed in BMMY medium with 2 % methanol, which was added every 24 hours. The cells were cultivated at 24 °C for 16 hours, followed by further cultivation at 18 °C for 56 hours, using a constant aeration (air flow of 5 L/min) and a stirrer speed of 500 rpm.

6.4.8 Purification of heterologous protein PPP1

After harvesting the cells, the culture supernatant was concentrated using Centricon Plus-70 centrifugal filter units (MWCO 10,000). The cell pellet was resuspended in 50 mM sodium-phosphate buffer (pH 7.5). Secondly, the cells were disrupted, using glass beads and a Precellys® homogenizer (Peqlab, Erlangen, Germany). After centrifugation at 13,000 x g and 4 °C for 10 min, the clear supernatant was subjected to immobilized metal affinity chromatography (IMAC). The concentrated culture supernatant was treated likewise. The samples were incubated with approximately 4 ml Protino® Ni-NTA Agarose (50 % slurry; Macherey-Nagel) in 50 ml reaction tubes for 90 to 120 min on ice, shaking slowly on a rocking platform. Following washing steps with 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 with 25 mM and 50 mM imidazole, the protein of interest was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 250 mM imidazole. Finally, the eluate was rebuffered to 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 using PD-10 desalting columns (GE Healthcare). The enzyme was either stored on ice for immediate use or at -20 °C for long term storage.

6.4.9 Peptidase activity assays

The activity of the native and heterologous samples was quantified utilizing a photometric assay with Z-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (AAPF; from Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) as substrate of the reaction. In a total volume of 150 µl, the reaction mixture consisted of 5 to 20 µl of sample, 133.3 µM AAPF (6.67 – 800 µM for the determination of

the Michaelis-Menten-constant) and a 50 mM sodium-phosphate buffer pH 8, or for the determination of the pH optimum 50 mM acetate (pH 3.5 – 5.5), bis-tris (pH 5.5 – 7), tris (pH 7 – 9), and glycine (pH 9 – 10.5) buffers, respectively. The stability was determined by incubating the enzyme for 30 minutes at different temperatures (sodium phosphate buffer pH 7.5) or at different pH values at 20 °C (Britton-Robinson buffers [122]). Measurements were performed using a BioTek Synergy 2 microtiter plate reader (Bad Friedrichshall, Germany). The cleavage of AAPF and the subsequent release of *p*-nitroaniline ($\epsilon^* = 4567 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) were monitored at $\lambda = 405 \text{ nm}$ at 37 °C for 90 min. The peptidolytic activity is presented as unit (U), with 1 U being the amount of activity necessary to release 1 μM of *p*-nitroaniline per minute.

For application assays standardized cloth, pre-stained with milk, blood and India ink (C-5-060; Center of Test materials, Vlaardingen, Netherlands), of roughly 0.5 cm diameter (using a hole puncher) were incubated with enzyme sample in a final concentration of 0.44 % (v/v) “Premium” detergent (no additional enzymes) for 1 to 4 hours at 30 °C and 200 rpm. Moreover, buffer blanks were carried out. All detergent application assays were performed in a 96-deep-well plate. The assays were evaluated visually or using the color detection (CMYK) of GIMP (version 2.8.10).

6.4.10 Gel electrophoresis and protein identification

The quality and activity of the samples were also analyzed by electrophoretic means. SDS-PAGE analysis was performed according to Laemmli [130] with 12 % (w/v) polyacrylamide gels. Semi-native gels with addition of gelatin or casein were prepared as single gels, following Eisele *et al.* 2011 [111]. Gels were run with 10 mA per gel at 4 °C. Bands were excised from the gels and subjected to nLC-ESI-QTOF-MS/MS identification after tryptic digest, as described previously [167].

6.5 Results/Discussion

6.5.1 Purification and identification of the native peptidase PPP1 from the culture supernatant

After the identification of the large potential of the peptidases from *P. ostreatus* [111, 168-170], further screenings were conducted (data not shown), leading to *P. pulmonarius* as a promising candidate for the desired activity. Using a sequence of IEF (active fractions at pH 4 to pH 6), ion exchange chromatography (IEX; 100 mM NaCl in elution buffer) and size exclusion chromatography (SEC; calculated molecular mass of 65 kDa) the protein PPP1 was purified to homogeneity (Figure 6-1), as shown by the single band in the SDS-PAGE. Around 40 % of the initial activity from the culture supernatant were recovered during the purification (data not shown). The prominent band at 30 kDa was excised and analyzed, identifying several peptides after tryptic digest and nLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis (Figure 6-2). Considering SDS-PAGE and SEC analysis, a dimerization of the PPP1 in the culture supernatant was indicated.

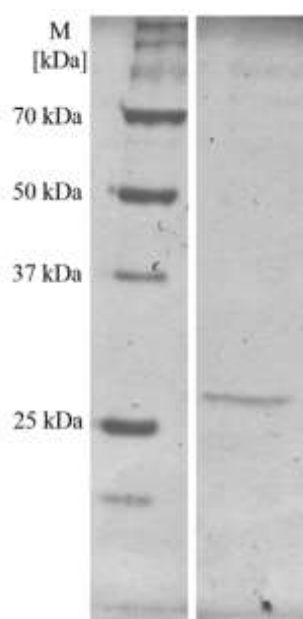


Figure 6-1

SDS-PAGE analysis of a 20 µl sample of the most active wild type protein fraction after the purification sequence of isoelectric focusing, ion exchange chromatography and size exclusion chromatography. The band of interest at about 30 kDa was excised and subjected nLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis for peptide identification. M - Precision Plus protein standard (Bio-Rad).

6.5.2 Sequence analysis and cloning of expression constructs

Using the obtained peptides of native PPP1, Blast searches were performed, which indicated the previously published peptidase POP1 from *P. ostreatus* [111] as the best hit. Primers were designed for the untranslated region of the gene *pop1* and a sequence of 1161 bp was identified in the cDNA library from *P. pulmonarius*. The gene was of 90 % sequence similarity to the known sequence of *pop1*. The coded protein sequence was identical in 94 % of all amino acids (Figure 6-2; ENA accession number LN878291/patent [162]). Analysis of the PPP1 sequence using SignalP 4.1 suggested the presence of a coding sequence for a native signal peptide (18 amino acids; Figure 6-2), which was subsequently eliminated to aid the heterologous expression. Additionally, the codon usage in *ppp1* was optimized to suit the expression host *P. pastoris*. The optimization of the coding sequence also involved the adaption of the GC content in the synthetic gene (originally 57 %, after optimization 48 %), which was shown to influence the heterologous gene expression efficiency [171]. Finally, the gene of interest was inserted into the pPIC9K vector using *EcoRI/NotI*, while also incorporating a second Kozak sequence following the alpha-factor coding region, which may serve as a secondary translation start as well as a spacer sequence, also capable of influencing the gene expression [172]. A potential protein would also include additional amino acids introduced by using the *EcoRI* restriction site in pPIC9K.

The presented amino acid sequence of PPP1 distinctively differed from commonly used detergent active peptidases from *Bacillus spec.* [173], showing only 40 % similarity to the M-protease from *Bacillus clausii* and 22 % to the kp-43 peptidase from *Bacillus spec.*, respectively.

```

POP1      MRLFSAVLASLATLAPAFAPALKTVESFAGQRNDGSFIVKLKSGASRSGLLKTGLGNAT
PPP1      MRLFSAVLASLALLAPAFAPALKTVESFAGQRNDGSFIVKLKSGASRSGLLKTGLGNAT
*****:*****

POP1      HEWDAALNGFAGKFSEKALNALRASPDVESISEDGIMHTFVTQTNAPWGLSRLTSATRLT
PPP1      HEWDAALNGFAGKFSEKALNALRASPDVESISEDGIMHTFVTQTNAPWGLSRLTSTSRLT
*****:***

POP1      NTNVAALTFTYTYDASAGSGVDVFVVDITGIFTSHSQFGGRARWGATFGPYADADGNGHGT
PPP1      NTNVAALTFTYTYDASAGSGVDVFVVDITGVFTSHSQFGGRARWGATFGPYADADGNGHGT
*****:*****

POP1      HCAGTIGGSQFGVAKSVNLIIVKVLSDGGSGSVADIVSGLNLFVLSSARSSGRPSIVMSML
PPP1      HCAGTIGGSQFGVAKSANIIIVKVLSDAGSGTVADIVSGLNLFVLSSARSSGRPSIVMSML
*****:*****

POP1      GGGASTALDनावASLTAGGVHVVAAGNSNVDAGTTSPARAPSAITVGASTITDTRASFS
PPP1      GGGASTALDनावASLTSGGVHVVAAGNSNTDAGTTSPARAPSAITVGASTIADARASFS
*****:*****

POP1      NFGSVVDVFAPGQDVISWIGSTTATNRIsgtSMATPHVAGLAAYLIALNGNSSPAALST
PPP1      NFGSVVDVFAPGQDVISWIGSTTATNRIsgtSMATPHVAGLAAYLIGLNGNSSPAALST
*****:*****

POP1      TIKSLSLKGVLSGIPSGTLNDLAHHA
PPP1      TIKSLSLKGVLTGIPSSTLNDLAHHA
*****:*****

```

Figure 6-2

Sequence alignment of two peptidases from *Pleurotus spec.*, POP1 and PPP1. Relevant features for both enzymes are emphasized (signal peptide prediction using SignalP 4.1 (light grey box); I9 inhibitor sequence (underlined dotted); amino acids forming catalytic triad and oxyanion hole (dark grey box)). Additionally, identified peptides for the native (grey) and heterologous (underlined) enzyme are highlighted.

6.5.3 Gene expression and protein purification

Following the construction of the expression system, the transformation of *P. pastoris* GS115, and the selection of resulting transformants, a multitude of clones were screened for the presence of peptidolytic activity.

Using 600 µl scale expressions, it was shown, that there was a major increase in peptidase activity in the culture supernatant, compared to the empty vector control. Constructs lacking the additional Kozak sequence did not yield an active PPP1. Due to the presence of *P. pastoris* peptidases, a low background activity was detectable in all cases. After identification of suitable clones, the culturing conditions were scaled up to obtain sufficient amounts of enzyme for the further biochemical characterization.

Cultures with volumes of up to one liter medium in 2.5 liter baffled shake flasks were inoculated and cultured under standard conditions. The cultivation temperature was reduced to 18 °C, which has been shown to improve yields of heterologous protein [174], while also aiming at reducing auto-proteolysis. In contrast to the deep-well cultivation, only little

extracellular activity was found in the supernatant of cultures in the baffled flasks, while the majority of activity was accumulated intracellularly. The enzyme for purification and biochemical analyses was obtained from the *P. pastoris* cell lysate fraction.

Upon Ni-NTA purification of the sample, activity assay as well as SDS-PAGE analysis showed that the majority of the produced enzyme was recovered in the elution fraction using 250 mM of imidazole. As it was possible to purify the active enzyme of interest using the C-terminal His-tag, it was shown that the additional amino acids do not interfere with the correct folding of the protein. Surprisingly, two separate bands (28 and 23 kDa, Figure 6-3) and an accumulation of bands at a lower molecular mass were obtained within the purified cell lysate fraction, while the empty vector control did not contain any bands (data not shown). Both bands from the active fraction were excised and subjected to peptide sequencing. Peptides matching the protein of interest were identified in either case (Figure 6-2). Additionally, the respective peptides were found in the protein fragments below 20 kDa, indicating auto-proteolytic activity within the sample, which was also observed by Eisele *et al.* (2011) [111]. Autolysis has been described as a major reason for activity loss of peptidases in detergent applications [175, 176].

The expected band size of the active peptidase PPP1 during SDS-PAGE analysis was around 30 kDa, as the peptidase must undergo different modifications to assume its activated form. The open reading frame of the pPIC9K x *ppp1* plasmid coded for a protein of 47 kDa, from which the alpha-factor (if translated; 9 kDa altogether) as well as the I9 peptidase inhibitor (approximately 9 kDa) are cleaved off.

Considering the lack of active PPP1 in constructs without the additional Kozak, it can be reasoned that the introduced sequence is mandatory for the production of active PPP1, serving as an alternative start for the translation. Similar effects were described by Kelle *et al.* for the production of a lipoxygenase in *P. pastoris* [163]. Taking an immediate auto-processing of PPP1 into account, including the elimination of the I9 inhibitor sequence (Figure 6-2) within the cell, the enzyme could not be secreted by *P. pastoris* in any case, due to the missing N-terminal secretion signal.

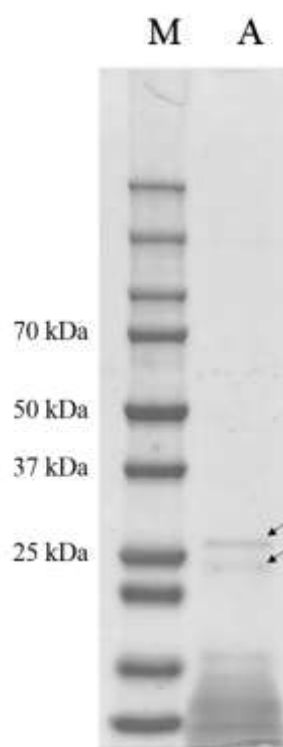


Figure 6-3

SDS-PAGE analysis of Ni-NTA purified recombinant PPP1 from *P. pastoris* cell lysate (A). Peptide fragments were found in different bands (arrows), also including < 20 kDa, indicating degradation of the protein. M - Precision Plus protein standard (Bio-Rad).

The presence of a low extracellular PPP1 activity, while lacking a secretion signal, may be caused by cell lysis in larger-scale cultures with high cell density [177]. Also, the heterologous active peptidase itself may favour the disintegration of cells.

Five liter scale production of the enzyme, either in shake flasks or a fermenter did result in similar concentrations of wet biomass (5-5.7 g/L) and active PPP1 (around 1,500 mU total). The optimization of the current protein yield and an improvement of the productivity of the recombinant cells on the bioreactor scale are the aim of further research.

6.5.4 Biochemical characterization

Enzymes suitable for detergent application must withstand higher temperatures and alkaline pH values. Using AAPF, a temperature optimum of 40 °C and a pH optimum at pH 8.5 to 9.0 was determined for the PPP1 (Figure 6-4a/c). The stability of the peptidase was vastly influenced by elevated temperatures. After 30 minutes of incubation at 35 °C, only one third of the initial activity was detected (Figure 6-4 b). The incubation of the enzyme in buffers with different pH values (Figure 6-4 d) yielded residual activities over 40 % in each sample measured, with an optimal stability around pH 6.3. Bovine serum albumin (67 µg/ml final) was added to each incubation in order to minimize the influence of

autolysis during the incubation. Without the added BSA, the residual activity was highest at pH 4 and significantly decreased with an increasing pH (data not shown). These findings corresponded to the measured pH optimum and the resulting increase of peptidolytic activity of PPP1.

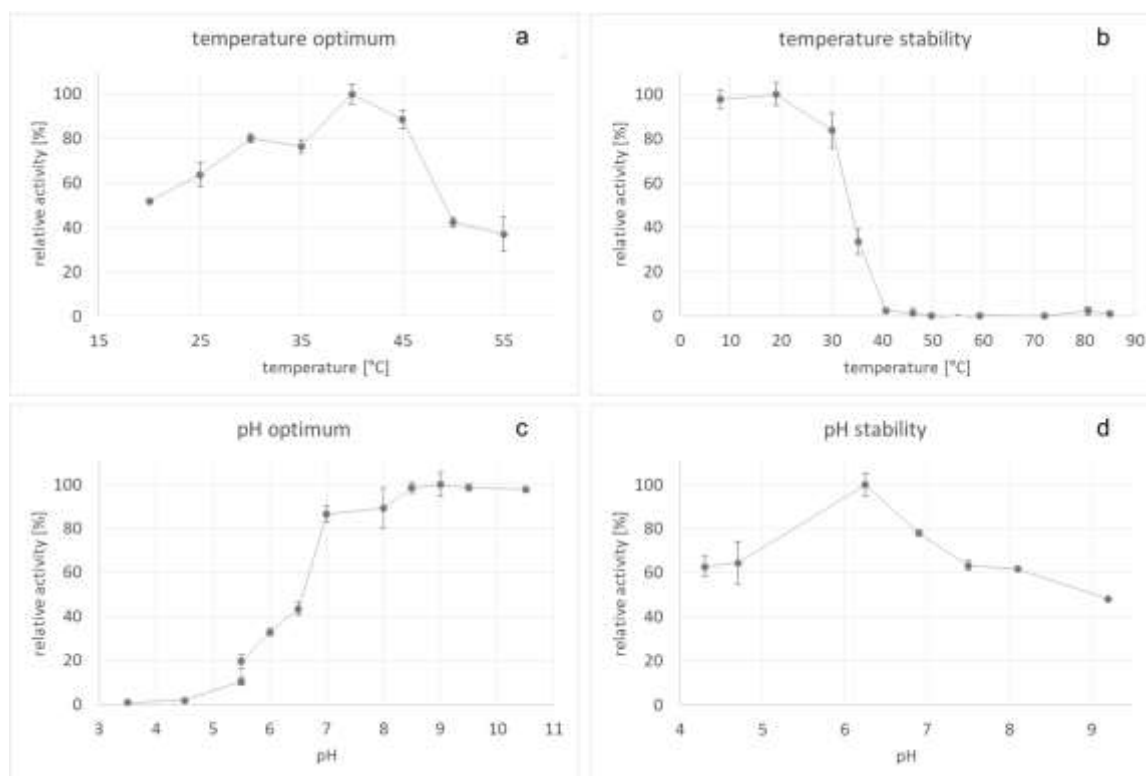


Figure 6-4

Biochemical characterization of PPP1. Assays for temperature optimum (a) and stability (b) were performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5), the pH optimum (c) was determined using different buffer systems (50 mM acetate (pH 3.5 – 5.5), bis-tris (pH 5.5 – 7), tris (pH 7 – 9) and glycine (pH 9 – 10.5)). The temperature stability (d) was determined after incubation of the enzyme for 30 min in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). The pH stability was determined after incubation of the enzyme in Britton-Robinsons buffer of the respective pH for 30 min at 20 °C. The subsequent AAPF assay was performed in 200 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0).

Furthermore, the kinetic constants were determined for the model substrate, resulting in values of c for K_m and 634 U l^{-1} for v_{\max} . The specific activity was determined to be around $1,800 \text{ U mg}^{-1}$ for AAPF, when measured under optimal conditions. The serine peptidase nature of PPP1 was confirmed using well known inhibitors, such as Chymostatin ($1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$), Leupeptin ($10 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$) and 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF; $100 \mu\text{M} - 10 \text{ mM}$), which yielded distinctively lower activities of PPP1 when added to the reaction (data not shown).

Compared to the previously described POP1 [111], the optima for pH and temperature range are similar, whereas the temperature stability differed significantly. Similar results regarding the temperature stability were also published by Dohmae *et al.*, (1995) for the purified native enzyme [168]. Despite the higher temperature (55 – 60 °C) and pH optima (pH 11 – 12) of the established *Bacillus spec.* peptidases [154], the PPP1 represented a potent alternative, especially under the topical milder and energy saving conditions.

Zymographies were carried out to identify further protein substrates of PPP1 (data not shown). The results indicated a clear degradation of the substrate in either case, but with a stronger effect on the gelatin, when using the same amount of peptidase. As described for a native peptidase from *Pleurotus ostreatus* [168], the heterologous PPP1 is capable of utilizing a variety of substrate molecules. Additionally, the peptidolytic activity was detected in the higher molecular mass range within the gel (> 70 kDa; data not shown), indicating the formation of enzyme aggregates of three or more molecules.

6.5.5 Application assay

The suitability of the PPP1 was investigated in 500 µl washing trials using purified enzyme and a detergent without any added enzymes to ensure that the washing effect was solely based on the PPP1. A purified empty vector control served as the negative control in each experiment. Two different approaches were taken to investigate which amount of enzyme would result in a visible bleaching/decoloration. 500 µl-scale washing experiments were performed in duplicate at 37 °C for 1 h (Figure 6-5). Different dilutions of PPP1 were evaluated to minimize the amount of enzyme needed for a significant washing effect. As visible in Figure 6-5, the use of 36 mU PPP1 resulted in a strong bleaching effect in either case, while 1/10 of the enzyme yielded no clear effect. The effect was also visible when evaluating the black value (K), with 42 % for 36 mU PPP1 and 55.5 % for the negative control. In this case the temperature stability (Figure 6-4 b) was the bottleneck, as the stability of PPP1 decreased rapidly with increasing reaction temperature, thus limiting the duration of action on the pre-stained cloth. This property may influence a potential application, but may be circumvented by encapsulation, coating or immobilization of the enzyme preparations to release the activity over a certain time during the washing process [106, 175, 176, 178]. Temperature stability is a continuing issue with all detergent enzymes, and protein engineering was often the remedy of choice [178].

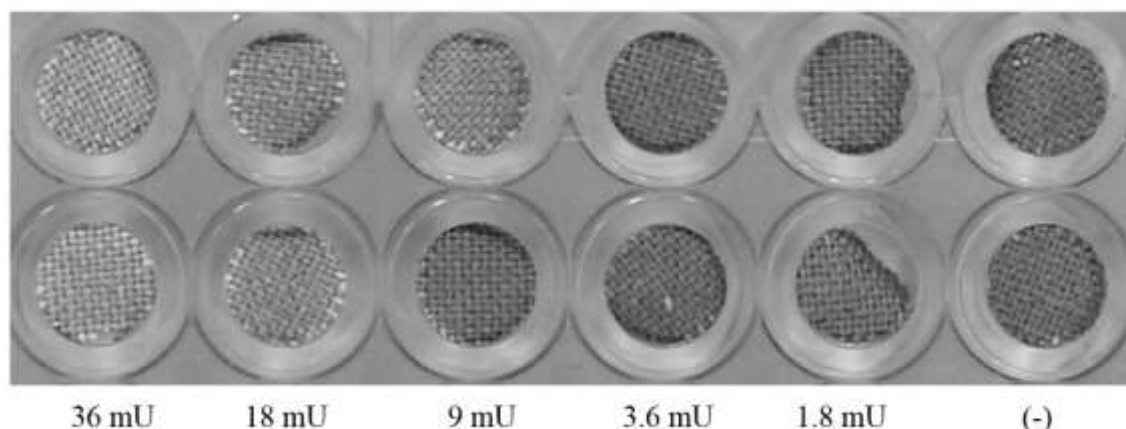


Figure 6-5

Application assay utilizing different amounts (1.8 to 36 mU) of Ni-NTA purified PPP1 on pre-strained cloth (C-5-060) in a total volume of 500 μ l. The duplicates were incubated for 1 h at 37 °C. (-) represents the washing result of the negative control (empty vector expression, Ni-NTA purified).

6.6 Conclusion

The purification of a basidiomycetous peptidase with a potential application in detergent formulations is described. The gene was heterologously expressed in *P. pastoris*. This work presents, to our best knowledge, the first functional heterologous subtilisin-like peptidase from a basidiomycete in *P. pastoris*. Thus, time consuming refolding steps, often needed when such enzymes were produced in *E. coli*, are avoided [111]. Both, adapting the codon usage and an additional Kozak sequence in combination were mandatory for functional production of this unique protein. PPP1 may be well suitable for bleaching discolorations consisting of blood, milk and India ink, with particular suitability for lower washing temperatures, typical of the more recent energy and cost efficient processes.

6.7 Acknowledgement

Support of the work by Henkel AG (Düsseldorf, Germany), is gratefully acknowledged. We thank Manfred Nimtze (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany) for his assistance with the identification of the native enzyme.

7. Ausblick

Die Suche nach homologen Genen, welche Enzyme einer bekannten bzw. gesuchten Aktivität codieren, ist nur ein erster Schritt in Richtung der Optimierung eines Biokatalysators. Wie in beiden publizierten Arbeiten gezeigt, war es möglich, mit Hilfe degenerierter Primer, Gene aus verschiedenen Stämmen zu amplifizieren. Dadurch können Gene und deren resultierende Proteine in größeren Ansätzen miteinander verglichen werden. Es können Organismen in das Screening einbezogen werden, die unter unkonventionellen bzw. ungewöhnlichen Wachstumsbedingungen gedeihen und somit, ähnlich den Extremophilen, eine den Umweltbedingungen angepasste biochemische Ausstattung besitzen. Es kann im Bereich der Basidiomycota noch nicht auf eine große Vielfalt von Sequenzen zurückgegriffen werden. Daher muss am Anfang der Vergleich der identifizierten Enzyme sowohl auf Aminosäure-, als auch auf Aktivitätsebene erfolgen. Auch sollten Genus-übergreifende Sequenzvergleiche angestellt werden, um eventuell kritische Aminosäurepositionen identifizieren zu können.

Mit Hilfe eines fundierten Wissens und aussagekräftiger Assays können dann die Effekte kleinerer und größerer Veränderungen der Proteinsequenz ausgewertet werden.

7.1 Lipoxygenasen

Die Aufklärung der unterschiedlichen Ausbeuten von Nootkaton sollte näher untersucht werden. Zu diesem Zweck müsste in einem vereinfachten Versuchssystem ohne undefinierten Zusatz von Lyophilisat untersucht werden, ob diese Effekte reproduzierbar sind. Die gleichen Eigenschaften bezüglich der Linolsäure könnten bedeuten, dass die Effekte von der Stabilität des Enzyms abhängen. So könnten Aminosäureaustausche eine veränderte Reaktion auf eventuellen oxidativen Stress durch die Hydroperoxide oder eine geringere Stabilität gegenüber Peptidasen bedeuten. Zusätzlich kann das Screening auf Oxidoreduktasen ausgeweitet werden, denen potenziell ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt.

7.2 Peptidasen

Auf Grund der großen Anzahl erforschter Peptidasen, ist eine gezielte Optimierung hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften denkbar. Subtilisin, als verwandtes Enzym, wurde in fast jeder Position bereits optimiert [69], und so lassen sich auch Rückschlüsse auf das vorliegende Enzym PPP1 ziehen. Beispielsweise könnten von Zhao *et al.* [71] beschriebene Änderungen auch auf PPP1 angewendet werden, um die Temperaturstabilität

zu beeinflussen. Im unten gezeigten Model (Abbildung 7-1) wurden zwei der beschriebenen Aminosäureaustausche in Subtilisin (S9F und P14L) auf die Sequenz von PPP1 übertragen (S11F und T16L; Nummerierung der maturierten Peptidase nach Abspaltung des I9-Inhibitors, siehe Figure 6-2). Die Modelle (angefertigt mit SWISS-MODEL [179]) wurden anschließend mit Hilfe des Algorithmus TM-Align [180] miteinander verglichen. Bereits mit diesen beiden Veränderungen wird ein Effekt vorhergesagt, der zu einer Verkleinerung ausgestülpter Bereiche des Proteins führt, ähnlich dem Vergleich Subtilisin E zu Thermitase (Abbildung 1-4).

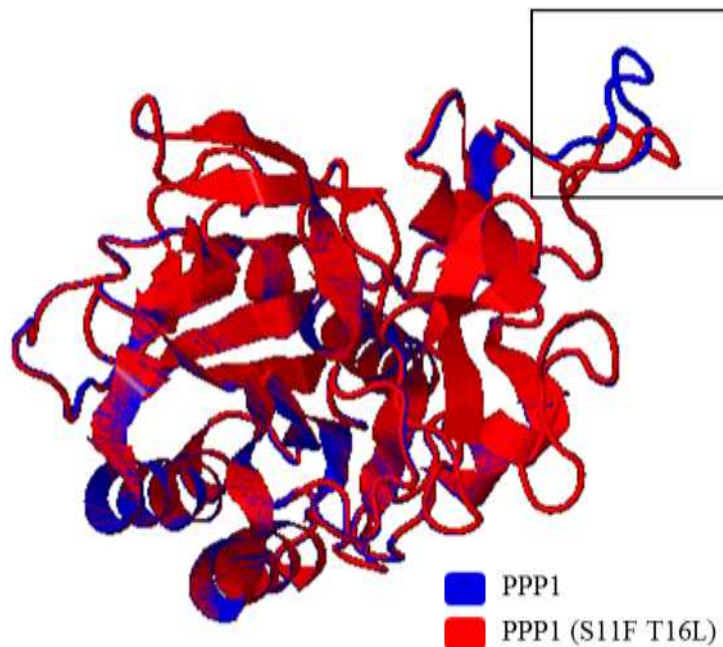


Abbildung 7-1

Strukturvergleich von PPP1 ohne Signalpeptid. Gegenüber der nativen Variante (blau) wurden analog zu Zhao *et al.* [71] zwei Aminosäuren ausgetauscht (S11F und T16L), die im Fall von Subtilisin E eine erhöhte Temperaturstabilität bewirkt haben. Beide Modelle wurden anhand des Templates *alkaline serine protease* ver112 (3f7m.1.A) erzeugt.

Zusätzlich ist es sinnvoll, weitere ähnliche Peptidase-Gene mit dem vorgestellten System zu amplifizieren und anschließend biochemisch zu charakterisieren.

Eine vorherige Optimierung des Expressionssystems muss allerdings erfolgen, um den Aufwand der folgenden Aufreinigung so gering wie möglich zu halten. Da die Peptidase sich autokatalytisch aktiviert und somit eine Sekretion in den Kulturüberstand verhindert, ist es denkbar, die Schnittstelle zur Abspaltung des I9-Inhibitors zu ersetzen. Dabei sind Systeme mit spezifischen Erkennungssequenzen einsetzbar, z. B. zur Abspaltung von His-*Tags* nach der Aufreinigung [181]. Im Idealfall könnte das Enzym intrazellulär inaktiv produziert und anschließend mit intaktem α -Faktor sekretiert und über Ni-NTA aus dem Kulturüberstand gereinigt werden. Die Abspaltung des Inhibitors und demnach die Aktivierung könnte mittels einer kommerziell verfügbaren Peptidase realisiert werden. Verunreinigungen und die kommerzielle Peptidase können dann von der Säule gewaschen werden, an die das rekombinante Enzym noch immer über den C-terminalen His-*Tag* gebunden bleibt.

Literaturverzeichnis

1. Jackel, C., P. Kast, and D. Hilvert, Protein design by directed evolution. *Annual Review of Biophysics*, 2008. 37: p. 153-73.
2. Lutz, S., Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010. 21(6): p. 734-743.
3. Martínez Cuesta, S., Syed A. Rahman, N. Furnham, and Janet M. Thornton, The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, 2015. 109(6): p. 1082-1086.
4. Boyle, J., Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2008. 36(4): p. 317-318.
5. Khersonsky, O., C. Roodveldt, and D.S. Tawfik, Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006. 10(5): p. 498-508.
6. O'Loughlin, T.L., W.M. Patrick, and I. Matsumura, Natural history as a predictor of protein evolvability. *Protein Engineering Design and Selection*, 2006. 19(10): p. 439-42.
7. Galperin, M.Y., D.R. Walker, and E.V. Koonin, Analogous enzymes: independent inventions in enzyme evolution. *Genome Research*, 1998. 8(8): p. 779-90.
8. Fitch, W.M., Homology a personal view on some of the problems. *Trends in Genetics*, 2000. 16(5): p. 227-31.
9. Fitch, W.M., Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. *Systematic Biology*, 1970. 19(2): p. 99-113.
10. Schwarz, F. and M. Aebi, Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011. 21(5): p. 576-82.
11. Gabaldon, T. and E.V. Koonin, Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nature Reviews Genetics*, 2013. 14(5): p. 360-366.
12. Wagner, G.P., The developmental genetics of homology. *Nature Reviews Genetics*, 2007. 8(6): p. 473-479.
13. Galperin, M.Y. and E.V. Koonin, Functional genomics and enzyme evolution. *Genetica*, 1999. 106(1-2): p. 159-170.

14. Dolinski, K. and D. Botstein, Orthology and functional conservation in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 2007. 41: p. 465-507.
15. Koonin, E.V., Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 2005. 39: p. 309-38.
16. Studer, R.A. and M. Robinson-Rechavi, How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? *Trends in Genetics*, 2009. 25(5): p. 210-216.
17. Koonin, E.V., R.L. Tatusov, and M.Y. Galperin, Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998. 8(3): p. 355-63.
18. Jensen, R., Orthologs and paralogs - we need to get it right. *Genome Biology*, 2001. 2(8): p. 1002.1 - 1002.3.
19. Zhang, J., Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003. 18(6): p. 292-298.
20. Conrad, B. and S.E. Antonarakis, Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2007. 8: p. 17-35.
21. Presgraves, D.C., Evolutionary Genomics: New Genes for New Jobs. *Current Biology*, 2005. 15(2): p. R52-R53.
22. Kuzniar, A., R.C.H.J. van Ham, S. Pongor, and J.A.M. Leunissen, The quest for orthologs: finding the corresponding gene across genomes. *Trends in Genetics*, 2008. 24(11): p. 539-551.
23. Koonin, E.V., K.S. Makarova, and L. Aravind, Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual Review of Microbiology*, 2001. 55: p. 709-42.
24. Lang, B.F., M.W. Gray, and G. Burger, Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 1999. 33: p. 351-97.
25. Blanchard, J.L. and M. Lynch, Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics*, 2000. 16(7): p. 315-320.
26. Salzberg, S.L., O. White, J. Peterson, and J.A. Eisen, Microbial genes in the human genome: lateral transfer or gene loss? *Science*, 2001. 292(5523): p. 1903-6.

27. Liu, H., Y. Fu, B. Li, X. Yu, J. Xie, J. Cheng, S.A. Ghabrial, G. Li, X. Yi, and D. Jiang, Widespread horizontal gene transfer from circular single-stranded DNA viruses to eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 2011. 11: p. 276.
28. Ryan, F.P., Human endogenous retroviruses in health and disease: a symbiotic perspective. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2004. 97(12): p. 560-565.
29. Hall, B.G., Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics*, 1990. 126(1): p. 5-16.
30. Sinha, R.P. and D.P. Hader, UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*, 2002. 1(4): p. 225-36.
31. Pfeifer, G.P., Y.-H. You, and A. Besaratinia, Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005. 571(1-2): p. 19-31.
32. Karp, G., *Molekulare Zellbiologie*. Vol. 1. 2005, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1000.
33. Zhang, Q.-M. and G.L. Dianov, DNA repair fidelity of base excision repair pathways in human cell extracts. *DNA Repair*, 2005. 4(2): p. 263-270.
34. Ward, A.J. and T.A. Cooper, The Pathobiology of Splicing. *The Journal of pathology*, 2010. 220(2): p. 152-163.
35. Kunkel, T.A., DNA replication fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(17): p. 16895-8.
36. Karaman, M.W. and J.G. Hacia, Genomes, 2nd edition. *Journal of Heredity*, 2003. 94(5): p. 432-433.
37. Viguera, E., D. Canceill, and S. Ehrlich, Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO Journal*, 2001. 20(10): p. 2587-2595.
38. Hastings, P.J., J.R. Lupski, S.M. Rosenberg, and G. Ira, Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics*, 2009. 10(8): p. 551-564.
39. Reams, A.B. and J.R. Roth, Mechanisms of gene duplication and amplification. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. 7(2): p. a016592.
40. Posada, D., K.A. Crandall, and E.C. Holmes, Recombination in evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 2002. 36: p. 75-97.

41. Kaessmann, H., N. Vinckenbosch, and M. Long, RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nature Reviews Genetics*, 2009. 10(1): p. 19-31.
42. Saravanan, M., K. Vasu, and V. Nagaraja, Evolution of sequence specificity in a restriction endonuclease by a point mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(30): p. 10344-7.
43. Muñoz-López, M. and J.L. García-Pérez, DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, 2010. 11(2): p. 115-128.
44. Beauregard, A., M.J. Curcio, and M. Belfort, The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annual Review of Genetics*, 2008. 42: p. 587-617.
45. Bornscheuer, U.T. and M. Pohl, Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. 5(2): p. 137-143.
46. Tracewell, C.A. and F.H. Arnold, Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009. 13(1): p. 3-9.
47. Powell, K.A., S.W. Ramer, S.B. Del Cardayre, W.P. Stemmer, M.B. Tobin, P.F. Longchamp, and G.W. Huisman, Directed Evolution and Biocatalysis. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2001. 40(21): p. 3948-3959.
48. Cohen, N., S. Abramov, Y. Dror, and A. Freeman, In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million. *Trends in Biotechnology*, 2001. 19(12): p. 507-510.
49. Lehmann, M. and M. Wyss, Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001. 12(4): p. 371-375.
50. Demirjian, D.C., F. Morís-Varas, and C.S. Cassidy, Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. 5(2): p. 144-151.
51. Schiraldi, C. and M. De Rosa, The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology*, 2002. 20(12): p. 515-521.
52. van den Burg, B., Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 2003. 6(3): p. 213-218.

53. Podar, M. and A.-L. Reysenbach, New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006. 17(3): p. 250-255.
54. Liszka, M.J., M.E. Clark, E. Schneider, and D.S. Clark, Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2012. 3: p. 77-102.
55. Paiardini, A., G. Gianese, F. Bossa, and S. Pascarella, Structural plasticity of thermophilic serine hydroxymethyltransferases. *Proteins*, 2003. 50(1): p. 122-34.
56. Morozkina, E.V., E.S. Slutskaia, T.V. Fedorova, T.I. Tugai, L.I. Golubeva, and O.V. Koroleva, Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 2010. 46(1): p. 5-20.
57. Ferrer, M., O. Golyshina, A. Beloqui, and P.N. Golyshin, Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 2007. 10(3): p. 207-214.
58. Tao, H. and V.W. Cornish, Milestones in directed enzyme evolution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002. 6(6): p. 858-864.
59. Lipovsek, D., E. Antipov, K.A. Armstrong, M.J. Olsen, A.M. Klivanov, B. Tidor, and K.D. Wittrup, Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display. *Chemistry & Biology*, 2007. 14(10): p. 1176-85.
60. Morley, K.L. and R.J. Kazlauskas, Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*, 2005. 23(5): p. 231-237.
61. Bommarius, A.S., J.K. Blum, and M.J. Abrahamson, Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011. 15(2): p. 194-200.
62. Wintrode, P.L. and F.H. Arnold, Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution. *Advances in Protein Chemistry*, 2000. 55: p. 161-225.
63. Declerck, N., M. Machius, G. Wiegand, R. Huber, and C. Gaillardin, Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase1. *Journal of Molecular Biology*, 2000. 301(4): p. 1041-1057.
64. Cherry, J.R. and A.L. Fidantsef, Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. 14(4): p. 438-43.

65. Sandgren, M., P.J. Gualfetti, A. Shaw, L.S. Gross, M. Saldajeno, A.G. Day, T.A. Jones, and C. Mitchinson, Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. *Protein Science*, 2003. 12(4): p. 848-60.
66. Hartley, B.S., N. Hanlon, R.J. Jackson, and M. Rangarajan, Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2000. 1543(2): p. 294-335.
67. Zhang, N., W.C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison, and A. Zaks, Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering*, 2003. 16(8): p. 599-605.
68. Cherry, J.R., M.H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, and A.H. Pedersen, Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 1999. 17(4): p. 379-84.
69. Bryan, P.N., Protein engineering of subtilisin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2000. 1543(2): p. 203-222.
70. Pantoliano, M.W., M. Whitlow, J.F. Wood, S.W. Dodd, K.D. Hardman, M.L. Rollence, and P.N. Bryan, Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding. *Biochemistry*, 1989. 28(18): p. 7205-13.
71. Zhao, H. and F.H. Arnold, Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Engineering*, 1999. 12(1): p. 47-53.
72. Russell, A.J. and A.R. Fersht, Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature*, 1987. 328(6130): p. 496-500.
73. Shaw, A., R. Bott, and A.G. Day, Protein engineering of α -amylase for low pH performance. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999. 10(4): p. 349-352.
74. Liu, L., B. Wang, H. Chen, S. Wang, M. Wang, S. Zhang, A. Song, J. Shen, K. Wu, and X. Jia, Rational pH-engineering of the thermostable xylanase based on computational model. *Process Biochemistry*, 2009. 44(8): p. 912-915.
75. Fang, T.Y. and C. Ford, Protein engineering of *Aspergillus awamori* glucoamylase to increase its pH optimum. *Protein Engineering*, 1998. 11(5): p. 383-8.
76. Suplatov, D., N. Panin, E. Kirilin, T. Shcherbakova, P. Kudryavtsev, and V. Švedas, Computational Design of a pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of Penicillin Acylase's Adaptation to Alkaline Conditions. *PLoS ONE*, 2014. 9(6): p. e100643.

77. Tomschy, A., R. Brugger, M. Lehmann, A. Svendsen, K. Vogel, D. Kostrewa, S.F. Lassen, D. Burger, A. Kronenberger, A.P. van Loon, L. Pasamontes, and M. Wyss, Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. 68(4): p. 1907-13.
78. Spector, S., M. Wang, S.A. Carp, J. Robblee, Z.S. Hendsch, R. Fairman, B. Tidor, and D.P. Raleigh, Rational modification of protein stability by the mutation of charged surface residues. *Biochemistry*, 2000. 39(5): p. 872-9.
79. Höhne, M., S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, and U.T. Bornscheuer, Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nature Chemical Biology*, 2010. 6(11): p. 807-813.
80. Bartsch, S., R. Kourist, and U.T. Bornscheuer, Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2008. 47(8): p. 1508-11.
81. Cahoon, E.B., Y. Lindqvist, G. Schneider, and J. Shanklin, Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. 94(10): p. 4872-7.
82. Estell, D.A., Engineering enzymes for improved performance in industrial applications. *Journal of Biotechnology*, 1993. 28(1): p. 25-30.
83. Chen, F., E.A. Gaucher, N.A. Leal, D. Hutter, S.A. Havemann, S. Govindarajan, E.A. Ortlund, and S.A. Benner, Reconstructed evolutionary adaptive paths give polymerases accepting reversible terminators for sequencing and SNP detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(5): p. 1948-1953.
84. Bornscheuer, U.T., C. Bessler, R. Srinivas, and S. Hari Krishna, Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, 2002. 20(10): p. 433-437.
85. Zhang, C., X. Zhou, F. Lu, X. Bie, T. Tao, Q. Ying, and Z. Lu, Cloning and expression of lipoxygenase gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 and purification, characterization of the recombinant enzyme. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2012. 28(4): p. 440-456.
86. Kapust, R.B. and D.S. Waugh, *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, 1999. 8(8): p. 1668-74.
87. Datta, S., L.R. Christena, and Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 2013. 3(1): p. 1-9.

88. Leonhardt, R.H., U. Krings, R.G. Berger, and D. Linke, Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016.
89. Otieno, O.D., C. Onyango, J.M. Onguso, L.G. Matasyoh, B.W. Wanjala, M. Wamalwa, and J.J. Harvey, Genetic diversity of Kenyan native oyster mushroom (*Pleurotus*). Mycologia, 2015. 107(1): p. 32-8.
90. Cohen, R., L. Persky, and Y. Hadar, Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. 58(5): p. 582-594.
91. Vilgalys, R., J.-M. Moncalvo, S.-R. Liou, and M. Volovsek. Recent advances in molecular systematics of the genus *Pleurotus*. 1996. Penn State University, College of Agricultural Sciences.
92. Urbanelli, S., V. Della Rosa, C. Fanelli, A.A. Fabbri, and M. Reverberi, Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Quel. Heredity, 2003. 90(3): p. 253-259.
93. Grigoriev, I.V., H. Nordberg, I. Shabalov, A. Aerts, M. Cantor, D. Goodstein, A. Kuo, S. Minovitsky, R. Nikitin, R.A. Ohm, R. Otillar, A. Poliakov, I. Ratnere, R. Riley, T. Smirnova, D. Rokhsar, and I. Dubchak, The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. Nucleic Acids Res., 2012. 40(D1): p. D26-D32.
94. Brash, A.R., Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(34): p. 23679-23682.
95. Oliw, E.H., Plant and fungal lipoxygenases. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 2002. 68-69: p. 313-23.
96. Matsui, K., Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. Current Opinion in Plant Biology, 2006. 9(3): p. 274-80.
97. Fraatz, M.A., S.J.L. Riemer, R. Stoeber, R. Kaspera, M. Nimtz, R.G. Berger, and H. Zorn, A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. 61(3-4): p. 202-207.
98. Krügener, S., U. Krings, H. Zorn, and R.G. Berger, A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. Bioresource Technology, 2010. 101(2): p. 457-462.

99. Ivanov, I., D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V.B. O'Donnell, H. Kuhn, and M. Walther, Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010. 503(2): p. 161-74.
100. Polgár, L., The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2005. 62(19-20): p. 2161-2172.
101. Kenny, A.J., Introduction: Nomenclature and Classes of Peptidases, in *Proteolytic Enzymes*, E. Sterchi and W. Stöcker, Editors. 1999, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-8.
102. Di Cera, E., Serine Proteases. *IUBMB life*, 2009. 61(5): p. 510-515.
103. Siezen, R.J. and J.A. Leunissen, Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science*, 1997. 6(3): p. 501-23.
104. von der Osten, C., S. Branner, S. Hastrup, L. Hedegaard, M.D. Rasmussen, H. Bisgård-Frantzen, S. Carlsen, and J.M. Mikkelsen, Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *Journal of Biotechnology*, 1993. 28(1): p. 55-68.
105. Carter, P. and J.A. Wells, Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature*, 1988. 332(6164): p. 564-568.
106. Maurer, K.-H., Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004. 15(4): p. 330-334.
107. Ness, J.E., S. Kim, A. Gottman, R. Pak, A. Krebber, T.V. Borchert, S. Govindarajan, E.C. Mundorff, and J. Minshull, Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. *Nature Biotechnology*, 2002. 20(12): p. 1251-1255.
108. Ness, J.E., M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J.R. Cherry, T.V. Borchert, W.P. Stemmer, and J. Minshull, DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nature Biotechnology*, 1999. 17(9): p. 893-6.
109. Zelena, K., U. Krings, and R.G. Berger, Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresource Technology*, 2012. 108: p. 231-9.
110. Plagemann, I., K. Zelena, P. Arendt, P.D. Ringel, U. Krings, and R.G. Berger, LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013. 87: p. 99-104.

111. Eisele, N., D. Linke, M. Nimtz, and R.G. Berger, Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 2011. 46(9): p. 1840-1846.
112. Plagemann, I., K. Zelena, P. Arendt, P.D. Ringel, U. Krings, and R.G. Berger, LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2012. 87: p. 99-104.
113. Fraatz, M.A., R.G. Berger, and H. Zorn, Nootkatone-a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009. 83(1): p. 35-41.
114. Leonhardt, R.-H. and R.G. Berger, Nootkatone. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 2015. 148: p. 391-404.
115. Husain, Q., Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006. 26(4): p. 201-21.
116. Hoffmeister, D. and N.P. Keller, Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 2007. 24: p. 393-416.
117. Haase-Aschoff, P., D. Linke, and R.G. Berger, Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource Technology*, 2013. 130: p. 231-238.
118. Bancarz, R. and G. Ginalska, A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterisation and esterification studies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007. 34(8): p. 553-560.
119. Abd El-Baky, H., D. Linke, W.A. Metry, O. El-Demerdash, and R.G. Berger, Submerged cultured basidiomycete fungi secrete peptidases with distinct milk clotting properties. *Advances in Food Sciences*, 2011. 33(2): p. 109-115.
120. Kuribayashi, T., H. Kaise, C. Uno, T. Hara, T. Hayakawa, and T. Joh, Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50(5): p. 1247-1253.
121. Gökmen, V., S. Bahceci, and J. Acar, Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Technology*, 2002. 215(1): p. 42-45.
122. Britton, H.T.S. and R.A. Robinson, CXC VIII.-Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society*, 1931: p. 1456-1462.

123. Huber, W. and E. Fröhlke, Ein neues Sprühreagens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden. *Chromatographia*, 1972. 5(4): p. 256-257.
124. Wilson, K.H., R.B. Blitchington, and R.C. Greene, Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990. 28(9): p. 1942-1946.
125. Grigoriev, I.V., D. Cullen, S.B. Goodwin, D. Hibbett, T.W. Jeffries, C.P. Kubicek, C. Kuske, J.K. Magnuson, F. Martin, J.W. Spatafora, A. Tsang, and S.E. Baker, Fueling the future with fungal genomics. *Mycology*, 2011. 2(3): p. 192-209.
126. Manske, M., GENTle, a free multi-purpose molecular biology tool. 2006.
127. McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y.M. Park, N. Buso, A.P. Cowley, and R. Lopez, Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41.
128. Sambrook, J.F., D.W. Russell, and Editors, *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. 2000: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2300 pp. (approx.).
129. Studier, F.W., Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 2005. 41(1): p. 207-234.
130. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-685.
131. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951. 193(1): p. 265-275.
132. Ng, P.C. and S. Henikoff, Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2006. 7: p. 61-80.
133. Chasman, D. and R.M. Adams, Predicting the Functional Consequences of Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms: Structure-based Assessment of Amino Acid Variation. *Journal of Molecular Biology*, 2001. 307(2): p. 683-706.
134. Collins, P.J. and A. Dobson, Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997. 63(9): p. 3444-3450.
135. Punelli, F., M. Reverberi, D. Poretta, S. Nogarotto, A.A. Fabbri, C. Fanelli, and S. Urbanelli, Molecular characterization and enzymatic activity of laccases in two *Pleurotus* spp. with different pathogenic behaviour. *Mycological Research*, 2009. 113(3): p. 381-387.

136. Tasaki, Y., S. Toyama, T. Kuribayashi, and T. Joh, Molecular characterization of a lipoxygenase from the basidiomycete mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013. 77(1): p. 38-45.
137. Coffa, G. and A.R. Brash, A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. 101(44): p. 15579-15584.
138. Maccarrone, M., M.L. Salucci, G. van Zadelhoff, F. Malatesta, G. Veldink, J.F.G. Vliegthart, and A. Finazzi-Agrò, Tryptic Digestion of Soybean Lipoxygenase-1 Generates a 60 kDa Fragment with Improved Activity and Membrane Binding Ability *Biochemistry*, 2001. 40(23): p. 6819-6827.
139. Minor, W., J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J.T. Bolin, R. Walter, and B. Axelrod, Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å... resolution. *Biochemistry*, 1996. 35(33): p. 10687-10701.
140. Ramachandran, S., R.T. Carroll, W.R. Dunham, and M.O. Funk, Limited proteolysis and active-site labeling studies of soybean lipoxygenase 1. *Biochemistry*, 1992. 31(33): p. 7700-7706.
141. Terpe, K., Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003. 60(5): p. 523-533.
142. Adebayo-Tayo, B.C., S.G. Jonathan, O.O. Popoola, and R.C. Egbomuche, Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharide production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 2011. 5(15): p. 2130-2138.
143. Aharoni, A., L. Gaidukov, O. Khersonsky, Q.G.S. Mc, C. Roodveldt, and D.S. Tawfik, The 'evolvability' of promiscuous protein functions. *Nature Genetics*, 2005. 37(1): p. 73-76.
144. Sadana, A., B.D. Kulkarni, and P.A. Ramachandran, Criteria for multiplicity for complex biochemical reactions. *Chemical Engineering Communications*, 1980. 7(6): p. 389-94.
145. Neurath, H. and K.A. Walsh, Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976. 73(11): p. 3825-32.

146. Islam, M.M., Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase from Japanese edible mushroom, *Grifola frondosa*: solving the structure - function anomaly of a reported aminopeptidase. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2008. 11(4).
147. Sabotič, J., T. Trček, T. Popovič, and J. Brzin, Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 2007. 128(2): p. 297-307.
148. Kudryavtseva, O.A., Y.E. Dunaevsky, O.V. Kamzolkina, and M.A. Belozersky, Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. *Microbiology*, 2008. 77(6): p. 643-653.
149. Bennett, G.F., *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* edited by J. Polaina, A. P. MacCabe. *Journal of Hazardous Materials*, 2008. 158(1): p. 215-216.
150. Spohner, S.C., H. Muller, H. Quitmann, and P. Czermak, Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2015.
151. Juarez-Montiel, M., J.A. Ibarra, G. Chavez-Camarillo, C. Hernandez-Rodriguez, and L. Villa-Tanaca, Molecular Cloning and Heterologous Expression in *Pichia pastoris* of X-Prolyl-dipeptidyl Aminopeptidase from Basidiomycete *Ustilago maydis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. 172(5): p. 2530-2539.
152. Erjavec, J., J. Kos, M. Ravnikar, T. Dreo, and J. Sabotic, Proteins of higher fungi--from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 2012. 30(5): p. 259-73.
153. Giesler, L., D. Linke, S. Rabe, D. Appel, and R.G. Berger, Hydrolysis of Wheat Gluten by Combining Peptidases of *Flammulina velutipes* and Electrodialysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. 61(36): p. 8641-8649.
154. Saeki, K., K. Ozaki, T. Kobayashi, and S. Ito, Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007. 103(6): p. 501-508.
155. Tavano, O.L., Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013. 90: p. 1-11.
156. Gupta, R., K. Gupta, R.K. Saxena, and S. Khan, Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 1999. 21(2): p. 135-138.
157. Rajput, R., R. Sharma, and R. Gupta, Cloning and characterization of a thermostable detergent-compatible recombinant keratinase from *Bacillus pumilus* KS12. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2011. 58(2): p. 109-118.

158. Sinha, R. and S.K. Khare, Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. *Bioresource Technology*, 2013. 145: p. 357-361.
159. Annamalai, N., M. Rajeswari, R. Thavasi, S. Vijayalakshmi, and T. Balasubramanian, Optimization, purification and characterization of novel thermostable, haloalkaline, solvent stable protease from *Bacillus halodurans* CAS6 using marine shellfish wastes: a potential additive for detergent and antioxidant synthesis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013. 36(7): p. 873-883.
160. Yang, X., H. Cong, J. Song, and J. Zhang, Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2013. 29(11): p. 2087-2094.
161. Kim, T. and X.G. Lei, Expression and characterization of a thermostable serine protease (TfpA) from *Thermomonospora fusca* YX in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005. 68(3): p. 355-359.
162. Hellmuth, H., T. Weber, T. O-Connell, S. Tondera, D. Linke, R.G. Berger, and R.-H. Leonhardt, A proteinase of *Pleurotus pulmonarius* for use in washing and cleaning agents. 2015, Henkel AG & Co. KGaA, Germany . p. 16pp.
163. Kelle, S., K. Zelena, U. Krings, D. Linke, and R.G. Berger, Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2014. 95: p. 233-9.
164. Petersen, T.N., S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011. 8(10): p. 785-786.
165. Lin-Cereghino, J., W.W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L.T. Luong, J. Vu, S.D. Johnson, and G.P. Lin-Cereghino, Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques*, 2005. 38(1): p. 44-48.
166. Sygmond, C., A. Gutmann, I. Krondorfer, M. Kujawa, A. Glieder, B. Pscheidt, D. Haltrich, C. Peterbauer, and R. Kittl, Simple and efficient expression of *Agaricus meleagris* pyranose dehydrogenase in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012. 94(3): p. 695-704.
167. Linke, D., R. Matthes, M. Nimtz, H. Zorn, M. Bunzel, and R. Berger, An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. 97(16): p. 7241-7251.

168. Dohmae, N., K. Hayashi, K. Miki, Y. Tsumuraya, and Y. Hashimoto, Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995. 59(11): p. 2074-80.
169. Palmieri, G., C. Bianco, G. Cennamo, P. Giardina, G. Marino, M. Monti, and G. Sannia, Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. 67(6): p. 2754-9.
170. Shin, H.H. and H.S. Choi, Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1998. 62(7): p. 1416-8.
171. Cregg, J., Introduction, in *Pichia Protocols*, J. Cregg, Editor. 2007, Humana Press. p. 1-10.
172. Lin-Cereghino, G.P., C.M. Stark, D. Kim, J. Chang, N. Shaheen, H. Poerwanto, K. Agari, P. Moua, L.K. Low, N. Tran, A.D. Huang, M. Nattestad, K.T. Oshiro, J.W. Chang, A. Chavan, J.W. Tsai, and J. Lin-Cereghino, The effect of alpha-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene*, 2013. 519(2): p. 311-7.
173. Yadava, A. and C.F. Ockenhouse, Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infection and immunity*, 2003. 71(9): p. 4961-9.
174. Dragosits, M., J. Stadlmann, J. Albiol, K. Baumann, M. Maurer, B. Gasser, M. Sauer, F. Altmann, P. Ferrer, and D. Mattanovich, The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *Journal of Proteome Research*, 2009. 8(3): p. 1380-92.
175. Stoner, M.R., D.A. Dale, P.J. Gualfetti, T. Becker, M.C. Manning, J.F. Carpenter, and T.W. Randolph, Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. 34(2): p. 114-125.
176. Vasconcelos, A., C.S.M. Silva, M. Schroeder, G. Guebitz, and A. Cavaco-Paulo, Detergent Formulations for Wool Domestic Washings Containing Immobilized Enzymes. *Biotechnology Letters*, 2006. 28(10): p. 725-731.
177. Lin-Cereghino, J. and J.M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 2000. 24(1): p. 45-66.
178. Rähse, W., Production of Tailor-Made Enzymes for Detergents. *ChemBioEng Reviews*, 2014. 1(1): p. 27-39.

179. Biasini, M., S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T.G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, and T. Schwede, SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 2014. 42(W1): p. W252-W258.
180. Zhang, Y. and J. Skolnick, TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(7): p. 2302-9.
181. Waugh, D.S., An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags. *Protein expression and purification*, 2011. 80(2): p. 283-293.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Robin-Hagen Leonhardt
Geburtsdatum: 08.08.1985
Geburtsort: Rathenow

SCHULBILDUNG

08/1992 – 07/1998 Grundschule Dissenchen, Cottbus
08/1998 – 06/2005 Heinrich-Heine-Gymnasium, Cottbus
06/2005 Abschluss Abitur

WEITERER WERDEGANG

08/2005 – 07/2006 Freiwilliges soziales Jahr, Johanniter-Unfall-Hilfe, Cottbus
09/2006 – 2/2010 Studium Biotechnologie (Abschluss B. Sc.)
Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg

Abschlussarbeit: „Untersuchungen zur Veränderung der mikrobiellen Diversität im Zusammenhang mit entzündlichen Veränderungen im Darm von Interleukin-10-defizienten Mäusen“
03/2010 – 11/2011 Studium Biotechnologie – Applied Microbiology
(Abschluss M.Sc.)
Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg

Abschlussarbeit: „Cloning and Characterization of a Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domain from *Ceriporiopsis subvermispora*“
11/2011 – 06/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion)
Leibniz Universität Hannover, Institut für Lebensmittelchemie